



# Amélioration de la thérapie cellulaire par greffes de biomatériaux cellularisés dans un modèle d'ischémie myocardique chez le rat

Hadhami Hamdi

## ► To cite this version:

Hadhami Hamdi. Amélioration de la thérapie cellulaire par greffes de biomatériaux cellularisés dans un modèle d'ischémie myocardique chez le rat. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. <NNT : 2012PA05T003>. <tel-00689003>

**HAL Id: tel-00689003**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00689003>**

Submitted on 19 Apr 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Descartes

Faculté de médecine

## **THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES**

Biochimie, Biothérapies, Biologie Moléculaire et Infectiologie  
Ecole doctorale B3MI

Présentée et soutenue publiquement par

**Hadhami HAMD**

**Le 10/02/2012**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES**

### **Amélioration de la thérapie cellulaire par greffes de biomatériaux cellularisés dans un modèle d'ischémie myocardique chez le rat**

**Devant le jury composé de :**

Mme Valérie PLANAT-BENARD

Président

M. Jérôme LARGHERO

Rapporteur

M. Jean-Thomas VILQUIN

Rapporteur

M. Onnik AGBULUT

Examineur

M. Philippe MENASCHÉ

Directeur de thèse

M. Abdelhedi MILED

Co-directeur de thèse

À mes parents

À la mémoire de ma grand-mère

## REMERCIEMENTS

Le mot merci n'est pas l'expression convenable et suffisamment représentative de mes sentiments envers toutes les personnes qui ont participé à ce travail. Sans leur soutien et leur encouragement cette thèse n'aurait pas vu la lumière du jour. Je ne peux que souhaiter à chaque humain vivant sur terre l'immense bonheur qui a encombré mon cœur durant ce travail.

Je voudrais tout d'abord remercier Monsieur Philippe Menasché d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Je le remercie pour sa rigueur scientifique et pour la confiance qu'il m'a accordée en me proposant de travailler sur ce sujet de thèse.

Je tiens à remercier Monsieur et Madame Carpentier qui m'ont accueilli au sein de la Fondation Alain Carpentier et qui m'ont permis de préparer ma thèse dans leur laboratoire.

Je suis très reconnaissante à Monsieur Onnik Agbulut pour sa disponibilité et pour nos discussions très instructives tout au long de cette thèse.

Je remercie également Monsieur Abdelhedi Miled qui a suivi mes travaux avec intérêt et m'a toujours soutenu tout au long de mes études.

Je remercie vivement Monsieur Jérôme Larghéro qui m'a fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie sincèrement Monsieur Jean-Thomas Vilquin pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Je tiens à remercier Madame Valérie Planat-Benard pour avoir accepté de présider cette thèse.

Je remercie énormément Monsieur Michel Pucéat pour son implication dans ce travail et sa rigueur scientifique.

Je remercie chaleureusement Monsieur Alain Bel, Madame Joulia Pouly, Monsieur Albert Hagège et Monsieur Hany Naemetalla pour leur participation active tout au long de ce projet de thèse.

Je tiens à exprimer tous mes remerciements à Monsieur Patrick Bruneval et Monsieur Juan-Carlos Chachques pour les conseils et la gentillesse qu'ils m'ont témoignés durant ce travail.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Francine Bruston pour toutes les discussions scientifiques et linguistiques, surtout les petits détails et les petites nuances qui m'ont permis d'améliorer la lisibilité de ce manuscrit.



Je tiens à dire un grand merci à Valérie B, Valérie V, Damelys, Etienne, Raghed, Annabel, les deux Laetitia, Lionel, Amilcar, Mélina, Séverine et Marie-Cécile pour l'aide qu'ils m'ont apportée avec toujours beaucoup de bonne humeur et de disponibilité.

Je remercie très sincèrement Jeanne, Chantal, Martine, Julie, Adrien, Nermine, Sylvie, Claire, Samantha, Cyril, Manuella et toutes les personnes du Laboratoire de recherches biochirurgicales/ Fondation Alain Carpentier. Votre gentillesse, votre convivialité, votre bonne humeur, vos rires et vos sourires, votre complicité et votre serviabilité, ont rendu la vie du laboratoire très agréable.

---

# Sommaire :

---

## Introduction Générale ..... 8

I. l'Insuffisance Cardiaque .....	9
A. Les différentes formes d'insuffisance cardiaque .....	9
B. Epidémiologie de l'insuffisance cardiaque .....	10
C. Traitement de l'insuffisance cardiaque .....	11
II. Concept de la thérapie cellulaire .....	12
III. Choix des cellules.....	14
A. Les myoblastes.....	16
B. Cellules mésenchymateuses d'origine adipeuse : Adipose Derived Stromal/Stem Cells (ADSC) .....	17
C. Les progéniteurs cardiaques dérivés de cellules souches embryonnaires.....	19
IV. Les limites de la thérapie cellulaire .....	22
A. Modifications génétiques .....	23
B. Pré-conditionnement thérapeutique et pharmacologique.....	23
C. Biomatrices .....	24
V. Ingénierie tissulaire .....	24
A. Matrices de polymères naturels .....	25
B. Matrices de polymères synthétiques .....	26
VI. Perspectives de l'ingénierie tissulaire .....	27
VII. Objectifs et organisation du travail .....	29

## Matériels et méthodes ..... 31

I. Modèles expérimentaux <i>in vivo</i> .....	32
A. Modèle chirurgical d'infarctus du myocarde.....	32
B. Greffes .....	33
C. Constitution des groupes.....	34
1. Etude 1 : Comparaison entre les effets de la couverture épicaudique via des biomatériaux cellularisés par rapport à ceux des injections conventionnelles de cellules (myoblastes squelettiques) .....	34
2. Etude 2 : Caractérisation des feuilles de cellules et optimisation de leur utilisation <i>in vivo</i> (cellules stromales du tissu adipeux).....	35
3. Etude 3 : Evaluation à long terme d'un patch composite (cellules stromales du tissu adipeux + progéniteurs cardiaques dérivés de cellules souches embryonnaires humaines) dans un modèle d'infarctus du myocarde.....	35
D. Modèle chirurgical de sacrifice .....	36
II. Culture cellulaire .....	37
A. Culture cellulaire à partir de myoblastes .....	37
1. Culture, préparation et évaluation des populations de myoblastes .....	37
1.1. Préparation des myoblastes .....	37
1.2. Evaluation des populations de myoblastes .....	37
2. Culture des myoblastes dans une matrice de collagène .....	38

3. Culture cellulaire sous forme de feuilles de myoblastes .....	38
3.1. L'ensemencement des myoblastes.....	38
B. Culture cellulaire à partir de cellules souches adipeuses (ADSC).....	39
1. Culture des ADSC .....	39
2. Culture des ADSC sous forme de feuilles de cellules .....	39
3. Caractérisation des feuilles d'ADSC .....	40
3.1. Test de formation des colonies « Colony-forming unit » (UFC)f .....	40
3.2. Tests de différenciation .....	40
C. Co-culture des cellules stromales du tissu adipeux autologue et de cellules cardiaques progénitrices dérivées de cellules souches embryonnaires humaines .....	41
1. Culture des cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) .....	41
2. Co-culture des ADSC avec les progéniteurs cardiaques sur la matrice GELFILM™ .....	42
III. Critères d'évaluation.....	44
A. Evaluation fonctionnelle par échographie transthoracique (ETT) .....	44
B. Evaluation histologique .....	44
1. Colorations de type Eosine-Hématoxyline .....	44
2. Coloration de type Rouge Sirius .....	44
C. Evaluation immunohistochimique .....	45
D. Biologie moléculaire.....	45
1. Extraction d'ARN et RT-PCR .....	45
2. PCR en temps réel.....	46
3. RT <sup>2</sup> Profiler PCR Array .....	46
E. Immunotransfert.....	47
IV. Analyse statistique .....	47

## Résultats ..... 49

I. Comparaison des effets de la couverture épocardique via des biomatériaux cellularisés par rapport à ceux des injections conventionnelles de cellules.....	50
A. Caractérisation des biomatériaux <i>in vitro</i> .....	50
1. Rétention des myoblastes .....	50
1.1. Culture cellulaire sur la matrice de GELFOAM® .....	50
1.2. Culture cellulaire sous forme de feuilles de cellules .....	51
B. Evaluation des greffes <i>in vivo</i> .....	52
1. Analyse fonctionnelle cardiaque.....	52
2. Quantification des myoblastes par RT-PCR après les greffes.....	53
3. Détection et phénotypage des myoblastes greffés par immunomarquage .....	54
4. Evaluation de l'angiogénèse et de la fibrose à un mois.....	54
4.1. Angiogénèse .....	54
4.2. Fibrose.....	56
II. Caractérisation des feuilles de cellules et optimisation de leur utilisation <i>in vivo</i> .....	58
A. Caractérisation des feuilles de cellules <i>in vitro</i> .....	58
1. Différenciation des ADSC sur support classique ou thermosensible .....	58
2. Détermination des gènes impliqués dans la formation de la matrice extracellulaire(MEC) .....	59

3. Vérification de l'expression des gènes de la matrice extracellulaire et de certains facteurs de croissance .....	60
4. Expression des protéines de la matrice extracellulaire .....	61
B. Evaluation des greffes <i>in vivo</i> .....	62
1. Survie des animaux.....	62
2. Evaluation de la fonction cardiaque .....	64
3. Evaluation immuno-histochimique .....	65
3.1. Détection des cellules greffées.....	65
3.2. Phénotypes des cellules greffées .....	66
III. Evaluation de patch composite dans un modèle murin d'infarctus du myocarde : .....	68
A. Caractérisation des patchs composites <i>in vitro</i> .....	68
1. Etude quantitative des cellulesensemencées sur le patch.....	69
1.1. Comptage des cellules au bleu de trypan .....	69
1.2. Quantification des progéniteurs cardiaques par PCR.....	70
2. Caractérisation phénotypique des cultures cellulaires mixtes sur le patch GELFILM™ .....	71
B. Evaluation des greffes <i>in vivo</i> .....	72
1. Analyse fonctionnelle cardiaque .....	72
2. Survie des animaux.....	75
3. Analyse immuno-histologique .....	76
3.1. Vérification de la présence des cellules greffées deux mois après transplantation.....	76
3.2. Evaluation de l'angiogénèse.....	76
3.3. Evaluation de la zone de fibrose .....	78
<b>Discussion .....</b>	<b>79</b>
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>92</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>95</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>113</b>

## Listes des tableaux :

Tableau 1 : Principales cellules candidates pour la thérapie cellulaire .....	13
Tableau 2 : Principaux Matériaux candidats pour la fabrication de matrices .....	27
Tableau 3 : Récapitulatif du 1er protocole <i>in vivo</i> .....	34
Tableau 4 : Récapitulatif du 2ème protocole <i>in vivo</i> .....	35
Tableau 5 : Récapitulatif du 3ème protocole <i>in vivo</i> .....	36
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des principaux anticorps primaires utilisés .....	45
Tableau 7 : Récapitulatif des principales amorces utilisées.....	46
Tableau 8 : Survie et prolifération des myoblastes <i>in vitro</i> .....	51
Tableau 9 : Evaluation de la fonction cardiaque chez les différents groupes de rats.....	52
Tableau 10 : Comparaison de la survie cellulaire entre les différents groupes .....	53
Tableau 11 : Comparaison du nombre de vaisseaux néoformés dans les différents groupes .....	55
Tableau 12 : Comparaison de la fibrose entre les différents groupes.....	56
Tableau 13 : Comparaison de l'expression des protéines impliquées dans la formation de la MEC entre les feuilles d'ADSC et ADSC en suspension.....	61
Tableau 14 : Comparaison de l'évaluation de l'échocardiographie avant et après greffes au sein des différents groupes.....	65
Tableau 15 : Quantification des cellules GFP positives dans les animaux qui ont reçu les cellules GFP+ .....	66
Tableau 16 : Survie et prolifération des cellules <i>in vitro</i> .....	69
Tableau 17 : Quantification des cellules humaines au sein des deux patchs GELFILM™ <i>in vitro</i> .....	70
Tableau 18 : Evaluation de l'évolution de la fonction cardiaque pendant 6 mois à partir de la veille des greffes .....	73
Tableau 19 : Comparaison de l'angiogénèse entre les différents groupes .....	77
Tableau 20 : Tableau récapitulatif des pourcentages de fibrose dans les différents groupes .....	78

## Listes des figures :

Figure 1 : Prévalence de l'insuffisance cardiaque aux Etats-Unis (en millions de patients) ...	11
Figure 2 : Illustration de la hiérarchie de la pluripotence des cellules souches .....	15
Figure 3 : Cycle d'activation des cellules satellites quiescentes .....	16
Figure 4 : Représentation schématique des principaux acteurs de l'ingénierie tissulaire .....	24
Figure 5 : Principales approches de l'ingénierie tissulaire du cœur .....	28
Figure 6 : Modèle d'infarctus du myocarde. A) La ligature de l'artère interventriculaire antérieure (AIV) est réalisée entre l'artère pulmonaire et l'auricule gauche. B) La zone infarctée est visualisée par le blanchiment du myocarde .....	32
Figure 7 : Greffe des cellules. Après sternotomie la zone de fibrose est repérée par le blanchissement de la cicatrice .....	33
Figure 8 : Réseaux transcriptionnels déterminant le phénotype cardiaque <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	42
Figure 9 : Patch de GELFILM™ (5 cm x 2,5 cm x 75 µm) réhydraté juste avant l'ensemencement des cellules .....	43
Figure 10 : Représentation graphique de l'évolution de la fraction d'éjection (avant et après greffes) dans les différents groupes .....	53
Figure 11 : Marquage des cellules greffées sein de la matrice GELFOAM <i>in vitro</i> (A) et <i>in vivo</i> (B-F) .....	54
Figure 12 : Représentation graphique de l'évaluation de l'angiogénèse dans les différents groupes .....	55
Figure 13 : Marquage anti-RECA au niveau du myocarde et au niveau de la matrice chez un rat recevant les myoblastes incorporés dans la matrice GELFOAM® .....	56
Figure 14 : Représentation graphique de l'évaluation de la fibrose entre les différents groupes .....	57
Figure 15 : Caractérisation de cultures d'ADSC sur le support thermosensible par rapport à un support classique .....	58
Figure 16 : Comparaison de l'expression des gènes de la MEC entre une culture des ADSC sur boîte thermosensible par rapport à une culture des ADSC sur support classique pendant 24h (A) et 48h (B) .....	60
Figure 17 : Comparaison de l'expression des gènes de la MEC entre une culture des ADSC sur boîte thermosensible par rapport aux ADSC en suspension .....	60
Figure 18 : Quantification de l'expression des gènes de certains facteurs de croissance à partir de cellules d'ADSC cultivées sur support thermosensible pendant 24h par rapport à ceux exprimés à partir de cellules en suspension .....	61
Figure 19 : Révélation des bandes correspondantes aux protéines intervenant dans la formation de la MEC .....	62
Figure 20 : Courbe de survie des animaux en fonction du type de greffe .....	63
Figure 21 : Courbe de survie des animaux en fonction du volume d'injectat .....	64
Figure 22 : Détection des cellules greffées grâce à l'anticorps anti-CD90 (A : les cellules de la feuille collées sur le myocarde) et à l'anticorps anti-GFP ((B : les cellules GFP+ dans la feuille, avant implantation), et (C et D : cellules GFP+ dans le myocarde 2 mois après la greffe)) .....	65
Figure 23 : Caractérisation des cellules greffées 2 mois après la transplatation grâce à des doubles marquages : anti-GFP/anti-CD68 (A-C), anti-GFP/anti-actinine (D-F) et anti-GFP/anti-RECA (G-I) (ADG : GFP ; BEH : CD68, alpha-actinine et RECA, respectivement ; CFI : images superposées) .....	67

Figure 24 : Obseravation microscopique des co-cultures ADSC et CSEh au sein du patch GELFILM.....	69
Figure 25 : Détermination du nombre des cellules humaines au sein des deux patchs GELFILM™ <i>in vitro</i> à partir de la courbe détalonnage.....	70
Figure 26 : Marquage des différentes populations colonisant le patch composite à fort grossissement.....	71
Figure 27 : Représentation graphique de l'évolution de la fraction d'éjection dans les différents groupes.....	74
Figure 28 : Représentation graphique de l'évolution de la fraction de raccourcissement dans les différents groupes.....	74
Figure 29 : Représentation graphique de l'évolution des volumes VTD dans les différents groupes.....	74
Figure 30 : Représentation graphique de l'évolution des volumes VTS dans les différents groupes.....	75
Figure 31 : Récapitulatif de la probabilité de survie des animaux dans les deux groupes. A : Groupe GELFILM™; B : Groupe GELFILM™ composite. Les chiffres à la base du graphique correspondent aux nombres de rats survivants à chaque mois d'intervalle pendant 6 mois.....	75
Figure 32 : Evaluation de l'angiogénèse dans les différents groupes.....	77

## Listes des abréviations :

Insuffisance cardiaque (IC)  
Fraction d'éjection (FE)  
Inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC)  
Cellules souches embryonnaires (CSE)  
induced Pluripotent Stem cells (iPS)  
basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)  
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)  
Adipose Derived Stromal/Stem Cells (ADSC)  
Colony Forming Unit-Fibroblast (CFU-F)  
Cellules souches mésenchymateuses (CSM)  
Moelle osseuse (MO)  
Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF $\beta$ )  
Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2)  
Acide polyglycolique (PGA)  
Acide polylactique (PLA)  
PolyTétraFluoroEthylène (PTFEe)  
Poly (Ethylène Glycol) (PEG)  
Hepatocyte Growth Factor (HGF)  
Artère interventriculaire antérieure (AIV)  
Artère pulmonaire (AP)  
Echocardiographie transthoracique (ETT)  
Sérum bovin fœtal (SBF)  
Stroma Vascular Fraction (SVF)  
Volume Télédiastolique (VTD)  
Volume Télésystolique (VTS)  
Fraction de Raccourcissement (FR)  
Vascular Cell Endothelial Adhesion molecule (VCAM)



# **Introduction générale**

## I. l'Insuffisance Cardiaque :

L'insuffisance cardiaque (IC) est un syndrome clinique complexe résultant de l'altération de la fonction de la pompe cardiaque (remplissage et/ou éjection du sang). En pratique, la Société Européenne de Cardiologie (ESC) propose une définition reposant sur l'association de trois critères, dont les deux premiers sont indispensables(1):

- Signes cliniques d'IC (dyspnée, asthénie, rétention hydrosodée conduisant à la congestion pulmonaire et/ou aux œdèmes périphériques)
- Mise en évidence objective (par échographie de préférence) d'une dysfonction cardiaque (systolique et/ou diastolique) au repos
- En cas de doute, réponse favorable au traitement (amélioration rapide des symptômes sous diurétiques).

### A. Les différentes formes d'insuffisance cardiaque :

On individualise habituellement deux mécanismes de dysfonction ventriculaire gauche (VG). i) Les dysfonctions systoliques du ventricule gauche, où le ventricule a une incapacité à se vider correctement, conduisant à une fraction d'éjection (FE) altérée inférieure à 45%. ii) Les insuffisances ventriculaires gauches à fonction systolique préservée (FEVG>45%), appelées aussi **insuffisance cardiaque diastolique**, dans lesquelles le ventricule se vide correctement mais ne peut se remplir de façon satisfaisante. Ceci peut être dû à un relâchement ventriculaire ralenti ou incomplet qui peut être transitoire, comme dans le cas de l'**ischémie aiguë**, ou soutenu comme dans l'**hypertrophie myocardique concentrique**. Les insuffisances cardiaques systolique et diastolique peuvent coexister chez le même malade comme dans le cas de l'infarctus du myocarde.

On distingue également l'**insuffisance cardiaque aiguë** et l'**insuffisance ventriculaire gauche chronique**. La première correspond le plus souvent à la décompensation d'un état chronique avec apparition brutale et progressive d'une dyspnée cardiogénique, caractérisée par des signes de congestion pulmonaire pouvant aller jusqu'à l'œdème aigu pulmonaire voire l'état de choc cardiogénique. Notre projet portera plus précisément sur l'insuffisance ventriculaire gauche chronique qui est bien tolérée grâce aux mécanismes d'adaptation (1).

## **B. Epidémiologie de l'insuffisance cardiaque :**

L'insuffisance cardiaque est une maladie fréquente qui frappe chaque année de 1 à 5 personnes ‰ dans les pays industrialisés tous âges confondus, avec une prévalence de 3 à 20‰. La survie à un an, tous stades confondus, est de l'ordre de 65% (2). L'âge moyen de survenue de l'insuffisance cardiaque est de 73,5 ans; 2/3 des patients ont plus de 70 ans (3).

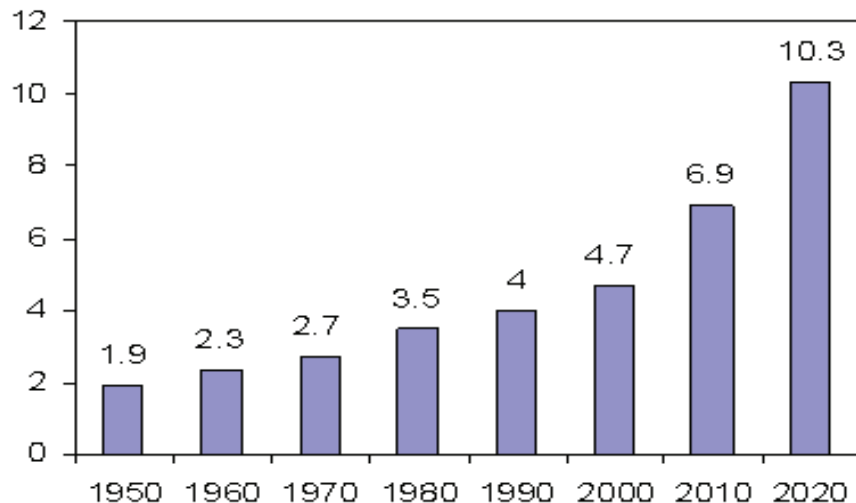
Les données de la Société Européenne de Cardiologie suggèrent qu'il y a au moins 15 millions de patients souffrant d'insuffisance cardiaque en Europe, sur une population de 900 millions d'habitants répartis dans 51 pays, soit une prévalence de 17‰ (4-8).

En France le nombre d'insuffisants cardiaques s'élevait en 2001 à 500 000, avec 120 000 nouveaux cas chaque année; l'incidence passe de 4‰ chez les hommes et 3‰ chez les femmes de 55 à 64 ans, à 50‰ chez les hommes et 85‰ chez les femmes de 85 à 94 ans. Il y a 3,5 millions de consultations et 150 000 hospitalisations pour insuffisance cardiaque par an, avec une durée moyenne de séjour de 11 jours. Plus de 32 000 décès annuels sont attribuables à l'insuffisance cardiaque. Les dépenses liées à cette maladie représentent plus de 1% des dépenses médicales totales (6).

La survie à cinq ans s'apparente à celles retrouvées dans les cancers du sein, de la vessie, du colon, de l'ovaire et de la prostate (7). Cependant, de récentes études montrent une diminution des chiffres de la mortalité, grâce notamment à l'amélioration de la prise en charge médicamenteuse (Inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) et bêtabloquants) et à la resynchronisation bi-ventriculaire (8). Des traitements efficaces ont permis de diminuer spectaculairement la mortalité dans le post infarctus, augmentant mécaniquement le nombre de patients coronariens insuffisants cardiaques. L'allongement de l'espérance de vie a également conduit à une augmentation du nombre d'insuffisants cardiaques: l'insuffisance cardiaque est devenue en quelques décennies un problème majeur de santé publique (9).

Aux Etats-Unis, il y a approximativement 5 millions d'Américains qui souffrent d'insuffisance cardiaque, et plus de 550 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année (8,10). On dénombre par ailleurs 12 à 15 millions de consultations et 6,5 millions de jours d'hospitalisation. De 1990 à 1999, le nombre annuel d'hospitalisations pour une première poussée d'insuffisance cardiaque a augmenté d'environ 23%, passant de 810

000 à plus de 1 million (11). Le nombre de patients insuffisants cardiaques pourrait atteindre 10 millions en 2020 avec un impact considérable sur le système de santé américain et représenter un fardeau économique significatif (12).



*Figure1* : Prévalence de l'insuffisance cardiaque aux Etats-Unis (en millions de patients).

### **C. Traitement de l'insuffisance cardiaque :**

La revascularisation myocardique par angioplastie ou par pontages coronariens , le traitement médicamenteux par l'adjonction d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion, l'association des bêtabloquants et récemment le traitement électrique (resynchronisation bi-ventriculaire et défibrillateur) ont représenté des progrès importants dans la prise en charge de l'IC.

Toutefois, dans les formes graves qui résistent à ces traitements, le seul traitement radical reste la transplantation cardiaque orthotopique. Elle ne peut néanmoins être proposée qu'à un nombre restreint de malades souffrant d'insuffisance cardiaque terminale (20,21) et reste grevée d'une morbi-mortalité qui n'est pas négligeable (principalement due au rejet chronique et aux complications de l'immunosuppression). Par ailleurs, la disponibilité réduite de greffons, qui va en s'aggravant dans les pays occidentaux, diminue encore les possibilités de transplantation.

Plusieurs approches thérapeutiques alternatives innovantes sont donc en cours d'exploration dans le but d'accroître l'espérance et la qualité de vie des patients ayant

épuisé les ressources du traitement médical, et néanmoins exclus de la transplantation cardiaque. Parmi ces options alternatives, la thérapie cellulaire suscite aujourd'hui un intérêt croissant (22).

## **II. Concept de la thérapie cellulaire :**

Selon l'article L 1211-1 du code de la Santé Publique, « la thérapie cellulaire concerne les produits biologiques à effet thérapeutique issus de préparation de cellules vivantes humaines ou animales ».

La thérapie cellulaire a pour objectif d'apporter un substrat susceptible de remplacer, réparer ou simplement accroître la fonction biologique défaillante de tissus ou d'organes endommagés.

Concernant l'insuffisance cardiaque ischémique, il semble que la production des cardiomyocytes qui se développe après l'infarctus soit de faible importance et ne permette pas de compenser la perte cellulaire. En l'absence d'une revascularisation précoce et efficace, la lésion devient irréversible et conduit à une cicatrisation fibreuse hypokinétique, akinétique ou dyskinétique, ainsi qu'à une aggravation du remodelage ventriculaire. La paroi ventriculaire devient plus fine et une dilatation des cavités cardiaques survient. Dans ce cadre, la thérapie cellulaire a pour objectif d'assurer la recolonisation et la restauration de la viabilité et des capacités fonctionnelles du tissu cardiaque lésé par des cellules à potentiel contractile (23). Il existe de nombreux types cellulaires répertoriés dans le Tableau 1 qui ont été utilisés pour améliorer les problèmes consécutifs à une ischémie cardiaque (24). Ces cellules ont été le plus souvent délivrées au tissu nécrotique par injections directes trans-épicaudiques, plus rarement par injections intra-coronaires ou endo-ventriculaires.

Principales sources de cellules candidates pour la thérapie cellulaire cardiaque			Etudes réalisées	
Cellules potentielles	Avantages	Inconvénients	Pré-cliniques	Cliniques
<b>Myoblastes</b>	Transplantation autologue Cellules contractiles Pas de problème d'histocompatibilité	Risque arythmogène Pas de couplage électromécanique ni de transdifférenciation en cardiomyocytes	+	+
<b>Cellules souches embryonnaires</b>	Prolifération indéfinie (in vitro) Différenciation en tissu cardiaque	Problèmes d'histocompatibilité Risque éthique, risque de tumeur	+	-
<b>Cellules mononuclées (moelle osseuse ou sang circulant)</b>	Transplantation autologue, Soutien de la néo-angiogénèse et recrutement des cardiomyocytes hibernants	Sous-populations cellulaires mal caractérisées	+	+
<b>Cellules mésenchymateuses (moelle osseuse)</b>	Transplantation autologue Soutien de l'angiogénèse	Culture <i>in vitro</i> nécessaire pour l'isolement et l'expansion Efficacité de différenciation ?	+	+
<b>Cellules souches hématopoïétiques</b>	Transplantation autologue Soutien de la néo-angiogénèse et de la cardiomyogénèse	Trans-différenciation en cellules cardiaques incertaine	+	+
<b>Cellules souches du tissu adipeux</b>	Transplantation autologue Tissu adipeux présent en grande quantité et facilement prélevé	Culture <i>in vitro</i> nécessaire pour l'isolement et l'expansion Pas de différenciation en cardiomyocytes	+	+
<b>Cellule souches du myocarde</b>	Transplantation autologue Possibilité de créer un tissu à l'identique	Culture <i>in vitro</i> nécessaire pour l'isolement et l'expansion Découverte récente devant être plus approfondie	+	+
<b>Cellules adultes induites à la pluripotence (iPS)</b>	Prolifération indéfinie (in vitro) Différenciation en cellules cardiaques	Efficacité de la reprogrammation ? Possibilité d'anomalies génétiques et épigénétiques	+	-

Tableau 1 : Principales cellules candidates pour la thérapie cellulaire.

Les premiers types cellulaires considérés ont été les cardiomyocytes fœtaux et les cellules musculaires squelettiques. Il semblait en effet logique, dans un premier temps, de tenter de remplacer le tissu cicatriciel par des cellules naturellement résidentes, les cardiomyocytes. D'un autre côté, l'intérêt porté aux cellules musculaires squelettiques reposait sur leur disponibilité, leur capacité à former du tissu contractile *in vitro* et *in vivo*, et sur leur résistance à l'ischémie. Cependant, la découverte de différents types de cellules souches a permis de proposer de nouveaux candidats. Ces cellules provenant de

différents compartiments de l'organisme (moelle osseuse, sang circulant, tissu adipeux...) et potentiellement capables de régénérer des tissus offraient l'espoir de trouver « la cellule souche » capable de se différencier en cardiomyocyte, de communiquer avec les cellules résidentes ou encore de participer à l'angiogénèse.

Les cellules les plus utilisées dans des protocoles cliniques de thérapie cellulaire ont été les cellules hématopoïétiques mononucléées ou mésenchymateuses de moelle osseuse (MO) et les myoblastes squelettiques. Cependant, jusqu'à présent, les résultats cliniques des essais de la thérapie cellulaire n'ont pas été à la hauteur des attentes soulevées par les études expérimentales qui les ont précédées.

Il est à noter que l'utilisation de cellules autologues n'engendre aucun problème immunologique, éthique ou de disponibilité de donneurs ou de tumorigénèse (25).

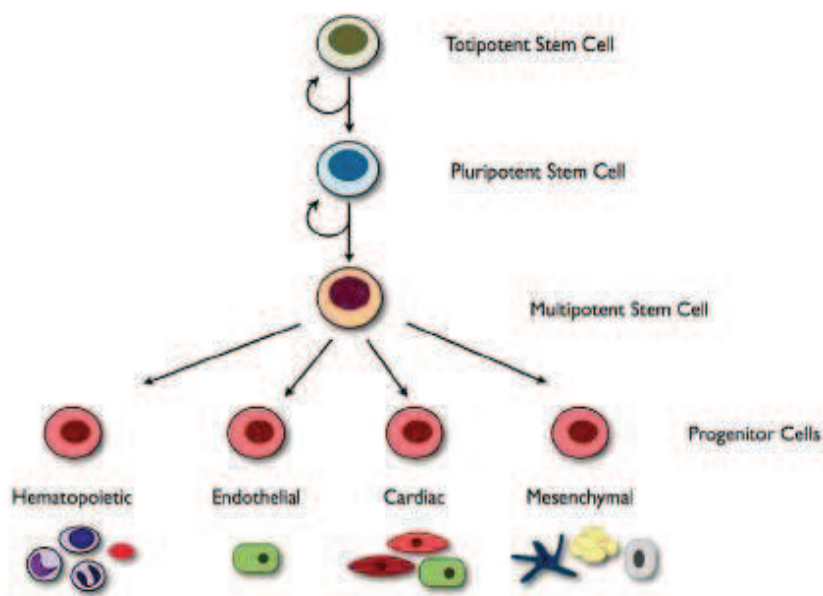
Depuis une dizaine d'années, les avancées en biologie cellulaire et moléculaire ont montré que l'irréversibilité génétique des cellules dites différenciées n'est plus aussi certaine. On sait désormais que presque tous les types de cellules, et non les seules cellules embryonnaires, possèdent une certaine plasticité. De nombreuses perspectives thérapeutiques régénératrices voient ainsi le jour avec l'avènement des cellules souches, embryonnaires ou adultes.

### III. Choix des cellules :

Une cellule souche est une cellule indifférenciée qui a la capacité de s'auto-renouveler quasiment indéfiniment à l'identique et d'engendrer par différenciation un grand nombre de cellules spécialisées. Afin d'assurer son auto-renouvellement, une cellule souche se divise de manière symétrique et asymétrique c'est-à-dire que sa division donnera à la fois une cellule qui sera capable de s'auto-renouveler et une cellule spécialisée. Il existe des cellules souches dans tous les tissus de l'organisme, qui se distinguent selon leur potentiel de différenciation : totipotence, pluripotence, multipotence ou unipotence.

Il existe une seule cellule souche **totipotente** ; l'œuf fécondé qui peut donner tout type de cellules et donc assurer le développement d'un organisme entier. Les cellules **pluripotentes** sont issues d'un embryon de 5 à 7 jours et peuvent se différencier en tout type de cellules de l'organisme sauf les cellules extra-embryonnaires comme le placenta. Ce sont

les cellules souches embryonnaires (ESCs) (26). Lorsqu'elles se spécialisent, elles donnent des cellules multipotentes spécifiquement dévolues à une fonction particulière. En effet, les cellules souches **multipotentes** sont des cellules capables de donner naissance à plusieurs types cellulaires issues du même feuillet embryonnaire, meso-,ecto- ou endodermique. Par exemple, les cellules souches hématopoïétiques sont des cellules multipotentes, uniquement capables de se transformer en tous les éléments figurés du sang. Enfin les cellules souches **unipotentes** ne peuvent donner qu'un seul type cellulaire avec une capacité d'auto-renouvellement plus limitée (Figure 2).



*Figure 2.* Illustration de la hiérarchie de la pluripotence des cellules souches. (D'après Sieveking).

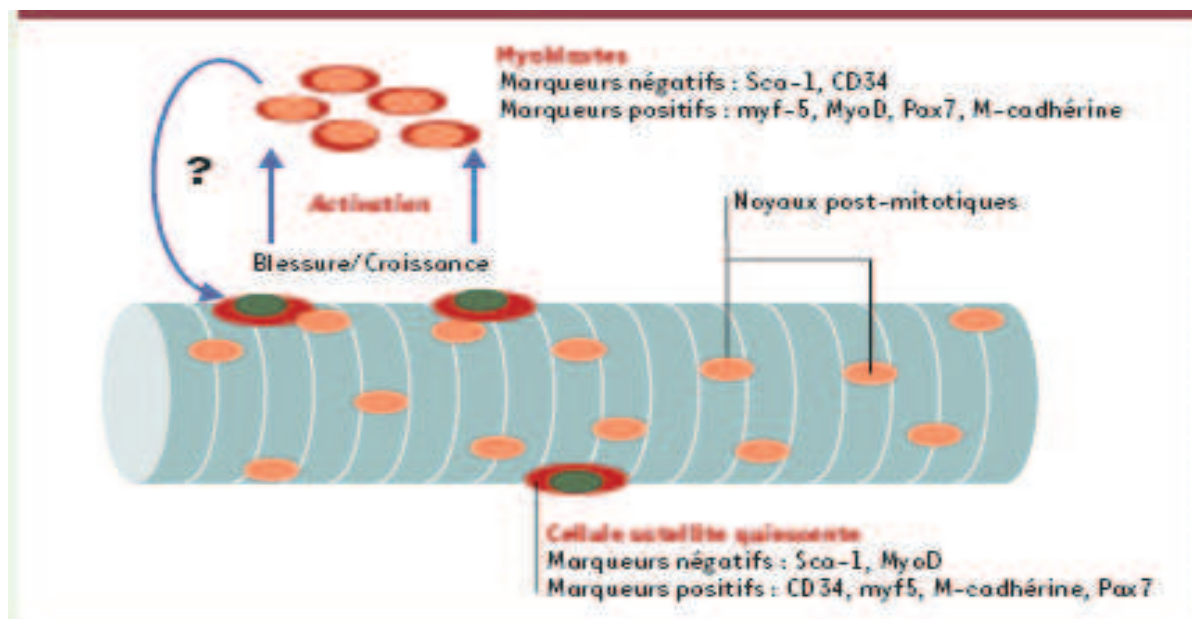
Par ailleurs, on distingue les cellules souches embryonnaires à fort potentiel d'auto-renouvellement des cellules souches adultes. Les cellules souches adultes, souvent issues de la moelle osseuse, du sang périphérique ou du cordon ombilical, peuvent être transplantées sans purification préalable (cellules mononucléées) ou après caractérisation sur la base de marqueurs de surface (progéniteurs endothéliaux, cellules souches mésenchymateuses). Les cellules souches peuvent aussi être extraites du tissu adipeux (27). D'autres cellules avec des caractéristiques de cellules souches peuvent être isolées à partir du myocarde (28). Plus récemment, des cellules souches pluripotentes ont pu être induites à partir de fibroblastes cutanés reprogrammés, (iPS pour induced Pluripotent Stem cells) (29).



Durant ce travail, nous nous sommes intéressés : i) aux cellules souches musculaires squelettiques ou myoblastes puisqu'il s'agit d'un type cellulaire assez connu en thérapie cellulaire et parfaitement adapté pour une étude de preuve de concept, puis ii) aux cellules mésenchymateuses stromales d'origine adipeuse pour optimiser l'efficacité thérapeutique de l'utilisation des cellules souches grâce à leur pouvoir trophique et iii) dans une perspective de régénération du myocarde, à des cellules progénitrices cardiaques dérivées de cellules souches embryonnaires humaines.

## A. Les myoblastes :

Le compartiment régénératif des fibres musculaires adultes est principalement constitué par les cellules satellites, maintenues à l'état quiescent sous la lame basale de ces fibres. La dégénérescence des fibres musculaires de causes traumatique, génétique ou autres, entraîne l'activation des myoblastes, leur prolifération et leur différenciation conduisant à la réparation par formation de nouvelles fibres musculaires.



**Figure 3:** Cycle d'activation des cellules satellites quiescentes chez l'homme (30)

L'accessibilité à ces cellules et la possibilité d'en cultiver un grand nombre à partir d'une petite biopsie musculaire, leur caractère différencié avec un risque tumorigène extrêmement faible, leur capacité à former du tissu contractile *in vivo*, leur résistance à l'ischémie ainsi que leur production autologue ont amené à envisager leur

utilisation dans le cadre de l'insuffisance cardiaque d'origine ischémique (30). L'expérience accumulée à l'aide de ce type cellulaire permet actuellement de le considérer comme un standard. Les bénéfices fonctionnels de ces transplantations ont été démontrés dans de nombreux modèles animaux et ont conduit à des essais cliniques de phase I (31–33). Les protocoles cliniques suivent trois étapes précises : 1) biopsie musculaire; 2) isolement cellulaire et culture primaire pendant 2 à 3 semaines de façon à obtenir un nombre suffisant de myoblastes ; 3) implantation des cellules dans la zone infarctée et péri-infarctée. L'utilisation du sérum humain autologue pour les cultures est recommandée afin d'éviter les phénomènes immunologiques observés avec l'utilisation de sérum bovin foetal.

Les résultats bénéfiques apportés par ces myoblastes semblent liés à l'importance de la lésion initiale, persistent sur de longues périodes, s'additionnent au bénéfice du traitement par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, et apparaissent directement corrélés au nombre de cellules transplantées (34,35). Cependant, un désavantage majeur de ces myoblastes dans la thérapie cellulaire de la cardiopathie ischémique est l'absence de conversion en cardiomyocytes et le risque de survenue de troubles graves du rythme ventriculaire. Le seul changement phénotypique observé est l'expression de la chaîne lente de la myosine et la différenciation en myotubes contractiles. Il n'y a pas de couplage électromécanique avec le tissu myocardique hôte (Connexine 43, N-Cadherine) : les cellules greffées restent ainsi isolées du myocarde hôte sans formation d'un syncytium fonctionnel (36). Le bénéfice fonctionnel observé serait ainsi lié à la limitation du remodelage et aux modifications des propriétés physiques du tissu cicatriciel (en limitant la zone d'expansion nécrotique). Une activation locale de l'angiogénèse a été également évoquée, les myoblastes sécrétant naturellement des facteurs de croissance tels le facteur de croissance des fibroblastes basiques (basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)) et celui de l'endothélium vasculaire (Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF) (24).

## **B. Cellules mésenchymateuses d'origine adipeuse : Adipose Derived Stromal/Stem Cells (ADSC) :**

Friedenstein a identifié des progéniteurs capables de produire des colonies de cellules d'allure fibroblastique (37). Ces progéniteurs ont été appelés CFU-F pour *Colony*

*Forming Unit-Fibroblast*. Ce n'est que très récemment que le concept de cellules souches mésenchymateuses (CSM) post-natales a émergé pour une utilisation thérapeutique. Les travaux de Prockop (38) et de Pittenger (39) ont permis l'identification, parmi la population des CFU-F, de cellules possédant des propriétés biologiques de cellules souches et depuis, de nombreuses études ont montré que les CSM sont potentiellement importantes dans la thérapie cellulaire.

À ce jour, la moelle osseuse (MO) est considérée comme la première source de CSM. Outre leur multipotentialité (40) et leurs propriétés immunosuppressives (41,42), les CSM dérivées de MO présentent une relative facilité d'isolement et d'expansion *in vitro*, une possibilité de cryopréservation et une manipulation génétique facile. Cependant, des CSM ayant des caractéristiques biologiques similaires ont été isolées à partir d'autres tissus.

Parmi les nombreux tissus étudiés, de plus en plus de chercheurs se focalisent sur le tissu adipeux étant donné sa facilité de prélèvement en grande quantité par liposuction. Le procédé d'isolement à partir de tissus adipeux de précurseurs capables de se différencier en adipocytes a été décrit dès les années 1960 (43). Ces cellules sont depuis appelées ADSC pour Adipose Derived Stroma/stem cells.

L'administration comparative de CSM de moelle osseuse ou de tissu adipeux dans différents modèles d'infarctus aigu du myocarde chez le porc (44), chronique chez le rat (45) ou du muscle ischémié de la patte chez la souris (46) permet de conclure que les cellules issues du tissu adipeux sont plus efficaces pour stimuler la néo-angiogénèse que les cellules issues de la moelle osseuse.

La preuve d'une contribution significative des CSM à la réparation cardiaque et vasculaire a été apportée dans de multiples modèles précliniques. Cependant leur capacité à générer des cellules fonctionnelles capables de remplacer les cardiomyocytes endommagés ou détruits semble limitée. Leurs effets bénéfiques sont plutôt associés à un rôle « stromal », un rôle de soutien qui tend à rétablir une homéostasie tissulaire via des sécrétions paracrines et des mécanismes régulateurs, afin de préserver la fonction ventriculaire contractile et une bonne perfusion tissulaire tout en modulant la réponse inflammatoire délétère. Les CSM représentent donc des candidats intéressants pour les thérapies cellulaires des pathologies cardiovasculaires (47).

Bien qu'utilisées actuellement dans plusieurs essais cliniques de thérapie cellulaire, il est cependant probable que les CSM ne parviendront pas à véritablement régénérer le myocarde malgré les effets bénéfiques décrits précédemment. La plasticité des cellules somatiques adultes semble en effet beaucoup plus limitée qu'on ne le pensait initialement (48,49). De façon plus spécifique, le fait que les cellules adultes greffées n'expriment pas les protéines de jonction leur permettant de se connecter avec les cardiomyocytes du receveur empêche la formation d'un véritable syncytium qui est pourtant le pré-requis pour que le greffon se contracte de façon synchrone avec les cellules de l'hôte (50) et contribue ainsi à améliorer la fonction du ventricule gauche. Il en résulte que les deux conditions principales pour que les cellules greffées atteignent leur objectif de « régénération » myocardique sont : i) une capacité d'intégration électromécanique dans le myocarde receveur, et ii) des propriétés contractiles leur permettant de générer une force active en réponse à un stimulus électrique approprié.

### **C. Les progéniteurs cardiaques dérivés de cellules souches embryonnaires:**

Les cellules souches embryonnaires (CSE) sont des cellules caractérisées par une pluripotence leur permettant de donner naissance aux tissus issus des trois feuillets embryonnaires. Aujourd'hui ces cellules semblent être les plus adéquates pour régénérer une zone infarctée.

Ces cellules paraissent particulièrement bien adaptées à une thérapeutique à visée régénérative pour trois raisons principales : i) une forte capacité proliférative dans des conditions appropriées *in vitro*, ii) la possibilité d'orienter leur différenciation vers la lignée cellulaire, notamment cardiaque (51), qu'elles sont supposées remplacer, et iii) la standardisation des procédés d'expansion, de prédifférenciation, de sélection et de contrôle permettant d'aboutir à un produit de thérapie cellulaire parfaitement bien caractérisé et aisément disponible.

Les données de la littérature concernant l'utilisation des CSE à des fins de régénération myocardique ont principalement porté sur les cellules d'origine murine. Globalement, les résultats montrent que ces cellules achèvent leur différenciation *in situ* en cardiomyocytes qui expriment, entre autre, les protéines constitutives des jonctions

communicantes (connexine 43). Cette évolution phénotypique est associée à une amélioration stable (jusqu'à 3 mois) de la fonction ventriculaire gauche et à un allongement de la survie par rapport à des animaux contrôles recevant seulement le milieu de culture (13–19). Bien que ces études n'aient comporté que l'injection d'une fraction de cellules prédifférenciées, aucune n'a montré la survenue de tératome. Il est possible que les cellules aient achevé leur différenciation en cardiomyocytes *in situ* sous l'influence de signaux locaux (au sein desquels les voies du facteur de croissance  $\beta$  de transformation (Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF $\beta$ )) et de la Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) semblent jouer un rôle majeur) (52,53) ou qu'elles aient seulement été éliminées du fait d'une sélection liée à l'environnement.

Plus rares sont encore les travaux menés avec des lignées de ESC (en français : CSE) humaines (ESCh). Toutefois, dans un modèle d'infarctus du myocarde chez la souris, les cellules de la lignée H7 survivent, se différencient en cardiomyocytes (exprimant notamment la connexine 43) et améliorent la fonction ventriculaire gauche (39). Cette évolution phénotypique a été également retrouvée chez le rat immunodéficient (54). Chez le porc, l'injection de cardiomyocytes dérivés des ESC humaines dans la paroi du ventricule gauche, après destruction du faisceau de His et, par conséquent, création d'un bloc auriculo-ventriculaire, permet la restauration d'un rythme cardiaque compatible avec la survie, des cartographies endocavitaires démontrant que le foyer greffé se comporte en véritable pacemaker, ce qui souligne bien la véritable capacité d'intégration électromécanique de ces cellules dans le cœur du receveur (55). Ces résultats ont été confirmés par des expériences de co-culture montrant que les mêmes cellules formaient avec les cardiomyocytes de rat un syncytium fonctionnel et sensible à une stimulation  $\beta$ -adrénergique (56). Une étude récente a permis d'isoler des cellules progénitrices cardiaques dérivées de CSEh qui se sont différenciées en cardiomyocytes contractiles lorsqu'elles ont été transplantées dans un modèle d'IC chez le primate et qui ont assuré la recolonisation de 20% de la zone infarctée (57).

De ces travaux émergent par ailleurs deux conclusions fondamentales dans la perspective d'applications cliniques : i) aucun tératome n'a été observé dès lors que les cellules sont prédifférenciées avant leur injection ; de même, les autopsies complètes réalisées chez les primates n'ont montré aucune tumeur à distance (57); ii)

contrairement à ce qu'avaient laissé espérer certains travaux, ces cellules ne semblent pas bénéficier d'un « privilège immunologique » ; même si des expériences par réaction mixte lymphocytaire indiquent qu'à un stade précoce, elles n'ont qu'une faible allo-réactivité, il n'en est apparemment pas de même pour leur filiation différenciée. En effet, lors de greffes de cellules pré-différenciées cardiaques issues de CSE de souris, un phénomène de rejet a été déclenché par stimulation des lymphocytes T (CD3 et CD56) (58). Une éventuelle utilisation clinique future requiert donc que soient mieux caractérisés ce rejet et les stratégies qu'on peut lui opposer.

Toutefois, dans le cadre des cellules susceptibles d'une différenciation cardiomyogénique, deux autres types cellulaires sont à considérer : les cellules souches cardiaques et les cellules adultes induites à la pluripotence (iPS).

Les cellules souches cardiaques sont de découverte plus récente que les précurseurs potentiels résidants dans les tissus extracardiaques. Ces cellules ont remis en cause le dogme du cœur conçu comme un organe « terminalement différencié » et donc sans aucune capacité d'auto régénération. Au moins trois problèmes majeurs restent toutefois en suspens : (i) la caractérisation phénotypique précise de ces cellules (à ce jour, au moins 4 marqueurs tous différents (Sca 1, *c-kit*, SP et Isl-1) ont été identifiés), (ii) le nombre résiduel de ces cellules dans un cœur adulte et (iii) leur persistance dans le cœur humain pathologique (59). Cependant, ces cellules ont fait l'objet d'un essai clinique dont les résultats préliminaires semblent très encourageants (60). Leur injection par voie intracoronaire est à l'origine d'une amélioration de la fonction systolique du ventricule gauche associée à une diminution de la zone de fibrose chez des patients souffrants d'infarctus du myocarde.

Quant aux cellules iPS, on commence à mieux cerner leurs limites : complexité d'une reprogrammation efficiente sans anomalies génétiques et épigénétiques, voire immunogénicité en dépit d'une origine autologue (61,62). Aussi s'accorde-t-on à en faire des outils efficaces pour le criblage de médicaments ou la modélisation de certaines maladies alors que les applications éventuelles en médecine régénérative semblent beaucoup plus lointaines. Pour ces différentes raisons, les CSE restent à ce jour les candidats les plus crédibles pour la génération *in vitro* de progéniteurs cardiaques qui, une fois greffés, pourront achever leur différenciation en cardiomyocytes sous l'influence des signaux locaux présents dans la cicatrice d'infarctus.

#### **IV. Les limites de la thérapie cellulaire :**

La mort ou la destruction massive de cellules durant les premières heures et premiers jours suivant l'injection (jusqu'à 90%), est un phénomène bien documenté dans le cas des myoblastes, des MSC et des cardiomyocytes (24,63,64).

Zhang et Beauchamp ont montré que l'absence de fixation des cellules entre elles et à la matrice extracellulaire les rend particulièrement vulnérables vis à vis des agressions du milieu extérieur. La perte du contact entre les cellules supprime les interactions qui leur permettent de s'orienter vers un phénotype spécialisé, de proliférer et de survivre. Ainsi, les cellules injectées meurent par nécrose consécutive à la privation en oxygène, par apoptose du fait de leur isolement et de leur relative sensibilité aux signaux apoptotiques (stress oxydant, lésions nucléaires) (63,64).

Cette mortalité est très probablement multifactorielle : contraintes physiques exercées sur les cellules pendant les injections (dégâts liés à la pression), réponse inflammatoire aux sites d'injection (destruction non spécifique par des neutrophiles), conditions hypoxiques de l'environnement, mais aussi facteurs biologiques intrinsèques (apoptose, absence de substrat adéquat...) (24). Ce phénomène a été bien décrit par Suzuki *et al* (65) dans un modèle d'infarctus chez des souris femelles traitées par injection de myoblastes radio-marqués à la Thymidine C<sup>14</sup> issus de mâles. Le nombre de cellules survivant à 10 minutes est de 39%, il est de 16% à 24 h, et de 7% à 72 h. De même, Huard *et al* (66) ont constaté une perte de plus de 90% des cellules injectées avant la 24<sup>ème</sup> heure en suivant la décroissance d'un marqueur exprimé par ces cellules (la  $\beta$ -galactosidase). L'augmentation du nombre de cellules injectées n'apporte pas de solution car en plus de la majoration du volume total injecté et de la multiplication des sites d'injection, elle amplifie la réponse inflammatoire et par conséquent augmente la vulnérabilité myocardique à l'arythmie.

Or, l'amélioration de la fonction obtenue par thérapie cellulaire est proportionnelle au nombre des cellules injectées survivantes. L'optimisation de la survie cellulaire est donc un objectif majeur et a été tentée par plusieurs méthodes génétiques, pharmacologiques ou de bio-ingénierie.



## **A. Modifications génétiques :**

La modification génétique des cellules souches avant leur injection représente une stratégie importante afin d'optimiser l'efficacité thérapeutique de la greffe. L'association de la thérapie génique avec la thérapie cellulaire permet d'améliorer la survie, les caractéristiques métaboliques, les capacités prolifératives ou la différenciation des cellules souches. Parmi les premières études intéressantes, celle de l'équipe de Dzau a montré que des CSM surexprimant le gène anti-apoptotique Akt sont plus résistantes à l'apoptose *in vitro* et *in vivo* (67). De plus, il a été mis en évidence une surexpression de différentes cytokines protectrices dans les CSM transfectées avec Akt notamment VEGF, HGF, b-FGF et IGF-1) (68). Cette transfection de CSM avec Akt permet donc de les protéger lors de la greffe et d'induire des effets paracrines bénéfiques dans le tissu cardiaque hôte. Des travaux ont montré que le pré-conditionnement de CSM avec la chimiokine SDF-1 inhibe l'apoptose de ces cellules après leur greffe, augmente leur survie et leur effet pro-angiogénique et améliore significativement la fonction cardiaque via la voie SDF/CXCR4 (69).

## **B. Pré-conditionnement thérapeutique et pharmacologique :**

La préparation des cellules avec divers stimuli pharmacologiques avant implantation est également une voie de recherche très active dans le but d'améliorer les capacités thérapeutiques de ces cellules. Il s'agit de pré-traiter les cellules avec des agents chimiques (70), des médicaments (71) ou des conditions hypoxiques (72). Dans ce contexte, il a été démontré que le traitement par choc thermique (Heat Shock) de myoblastes améliore leur tolérance à la séquence hypoxie-réoxygénation *in vitro* et réduit significativement leur mort après greffe intracardiaque (73). Une autre étude récente indique que l'induction de ce choc thermique sur des myoblastes augmente l'expression de la protéine hsp70 (heat shock protein 70) et protège les cellules de l'apoptose *in vitro*. De plus, ce traitement diminue la mort des myoblastes 24 heures après leur greffe et augmente considérablement le nombre de fibres musculaires issues de ces cellules en comparaison avec l'injection de cellules non traitées (74).

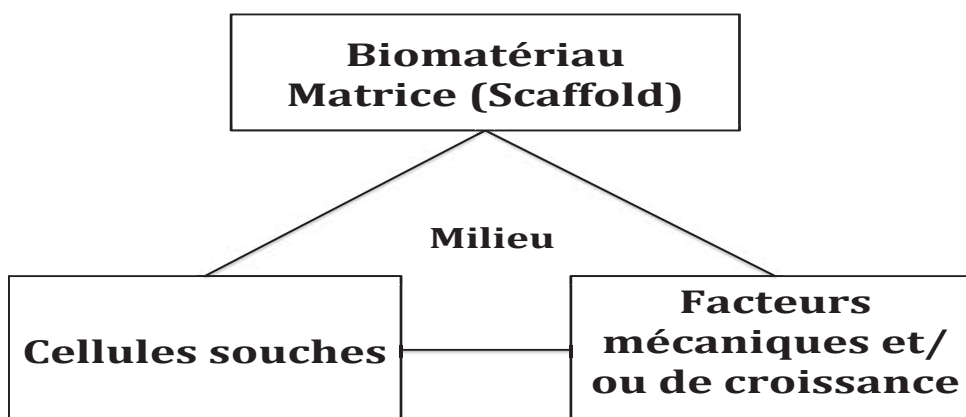


### C. Biomatrices :

Les approches d'ingénierie tissulaire offrent la possibilité d'utiliser des biomatériaux permettant à la fois de servir de support mécanique lors de la greffe mais aussi d'améliorer la survie, la différenciation et l'activité globale des cellules souches (75). La plupart de ces stratégies d'ingénierie tissulaire repose sur une transplantation de cellules souches déposées ou encapsulées dans une biomatrice formant ainsi un microenvironnement tridimensionnel propice à la rétention et par conséquent à la survie, à la prolifération et à la différenciation cellulaire. L'utilisation de cette nouvelle approche d'ingénierie tissulaire dans le domaine de la thérapie cellulaire semble donc très séduisante et a déjà montré de réels effets bénéfiques sur la survie post-greffe des cellules souches.

### V. Ingénierie tissulaire :

L'ingénierie tissulaire est un domaine scientifique qui combine les principes de la biologie cellulaire et de l'ingénierie dans le but de créer des substituts biologiques naturels ou synthétiques, simples ou hybrides qui restaurent, maintiennent ou améliorent la fonction tissulaire et apportent un résultat stable dans le temps (75,76). Elle implique l'interaction entre trois éléments principaux : le biomatériau ou matrice, les cellules et les facteurs mécaniques et/ou de croissance (*Figure 4*).



**Figure 4 :** Représentation schématique des principaux acteurs de l'ingénierie tissulaire.

La plupart des stratégies d'ingénierie tissulaire reposent sur une transplantation de cellules souches déposées ou encapsulées dans une biomatrice. La matrice définit

l'environnement tridimensionnel et fonctionnel du tissu. Deux types de matrices, les polymères synthétiques et les polymères naturels, sont principalement utilisés.

### **A. Matrices de polymères naturels :**

Ces dernières présentent l'avantage d'être biocompatibles, biorésorbables et sont produites sans faire appel à des solvants organiques, des intermédiaires réactionnels toxiques ou des températures élevées (77). Les polymères naturels représentent *a priori* un matériau de choix pour l'ingénierie tissulaire cardiaque puisqu'ils sont constitués de composants purs de la matrice extracellulaire (comme le collagène ou la fibrine) ou de tissus biologiques natifs (78).

Le collagène, les glycosaminoglycanes et les polymères de fibrine sont les plus couramment employés du fait de leur bonne capacité à soutenir la fonctionnalité cellulaire (survie, prolifération, différenciation...). Etant le constituant majeur de la matrice extracellulaire cardiaque, le collagène est devenu depuis quelques années l'un des supports le plus utilisé pour la culture cellulaire (79–82). Il est, mécaniquement stable, permettant une reconstitution tissulaire *in vitro* et pouvant assurer la libération de médicaments ou de facteurs de croissance *in vivo* (83,84). Son utilisation est à l'origine d'une amélioration fonctionnelle associée à une diminution de la taille de l'infarctus et à une augmentation de l'angiogénèse quand il est cultivé avec différents types de cellules souches dans des modèles expérimentaux d'insuffisance cardiaque (82). Le collagène comme l'agarose, peuvent être utilisés sous forme de microsphères dans lesquelles sont encapsulées les cellules. Ces capsules améliorent, elles aussi, la survie des cellules et permettent aux cytokines sécrétées d'exercer leurs effets sur les tissus receveurs lésés (88,89).

Des cellules souchesensemencées sur des polymères de fibrine sont à l'origine d'une sécrétion de nombreuses cytokines pro-angiogéniques *in vivo* favorisant la néo-vascularisation du tissu lésé et préservant sa fonction (90,91). Les matrices liquides de fibrine stimulent la restauration tissulaire en améliorant la survie des cellules greffées, la vascularisation et la fonction cardiaque (91–93). Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant des biomatériaux à base d'alginate par Cohen et al (94). L'alginate est un polysaccharide chargé négativement, extrait à partir d'une famille d'algues. Il forme un hydrogel en présence de calcium et peut êtreensemencé avec des

cellules cardiaques pour assurer leur prolifération et leur migration dans le tissu hôte (94–96). Certains hydrogels peuvent avoir des caractéristiques mécaniques qui s'adaptent bien aux propriétés élastiques du tissu cardiaque (97).

D'autres chercheurs ont favorisé l'utilisation des tissus décellularisés par traitements enzymatiques comme support naturel tel que le péricarde humain (98–100). Il s'agit d'un traitement réalisé pour diminuer l'antigénécité et le risque de calcification normalement majorés par les cellules pré-ensemencées ou les cellules endogènes circulantes qui recolonisent la matrice (101). En plus la greffe d'une telle matrice tissulaire décellularisée d'origine allogénique ou xénogénique pourrait permettre de conserver de nombreuses propriétés structurelles et mécaniques du tissu natif par le maintien de la composition de sa matrice extracellulaire (100,102).

## **B. Matrices de polymères synthétiques :**

Une matrice (naturelle ou synthétique) sert de support temporaire jusqu'à ce que les cellules ensemencées soient capables de produire leurs propres protéines matricielles (103). L'un des avantages majeurs de l'utilisation des matériaux synthétiques est la possibilité de contrôler la porosité, la structure, l'organisation et l'alignement des polymères constituant la matrice (104). Les propriétés physico-chimiques et le taux de dégradation du polymère sont généralement déterminés en fonction de la vitesse de formation du néo-tissu et de son évolution (105).

L'acide polyglycolique (PGA), l'acide polylactique (PLA) et leurs copolymères sont des polymères synthétiques biocompatibles qui ont été parmi les premiers matériaux artificiels utilisés dans l'ingénierie tissulaire du cœur. Ils ont initialement montré une instabilité mécanique et leur caractère acide était susceptible de produire des réactions immunitaires et inflammatoires (106). Récemment, ces biomatériaux ensemencés avec des CSM ont néanmoins permis une amélioration de la survie cellulaire associée à une prévention du remodelage ventriculaire négatif (107).

Bien qu'il présente le matériau le plus utilisé en chirurgie de pontage vasculaire, le PolyTétraFluoroEthylène (PTFEe) a une résistance mécanique assez faible et subit souvent des dégradations chimiques (108,109). Cependant, des biomatériaux à base de Poly (Ethylène Glycol) (PEG) ou de Poly (glycerol sabacate) ont montré leur efficacité pour s'adapter aux conditions électromécaniques et contractiles du cœur (110,111).

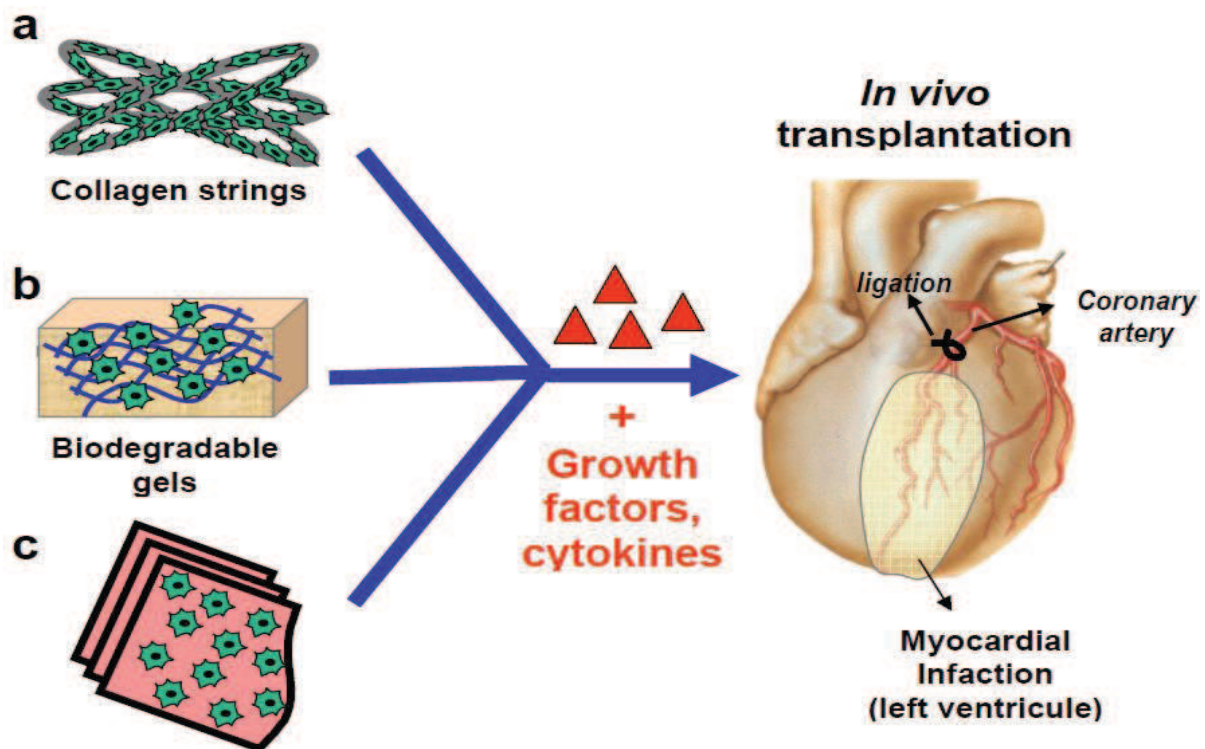
Les principaux biomatériaux utilisés dans l'ingénierie tissulaire cardiaque sont résumés dans le Tableau 2.

<b>Naturels</b>
Matrices gélatineuses (112)
Matrices poreuses d'alginate (91-93)
Matrices de collagène (79-82)
Matrices de colle de fibrine (91-93)
Matrices de tissus décellularisés (98,102)
<b>Synthétiques</b>
Composés dérivés des acides polylactique, polyglycolique et de leurs isomères (106,107)
Matrices de fibrinogène et polyéthylèneglycol (PEG) (113)
Matrice de PolyTétraFluoroEthylène (PTFEe) (108,109)
Matrice de poly GlycerolSebacate (PGS) (110,111)
Matrices de polyuréthane (114)

*Tableau 2 :* Principaux Matériaux candidats pour la fabrication de matrices

## **VI. Perspectives de l'ingénierie tissulaire :**

Le progrès de l'ingénierie tissulaire a permis de développer des techniques alternatives qui utilisent les matrices (naturelles ou synthétiques) non seulement comme simple véhicule de transfert de cellules (Figure 5 a et b) mais plutôt comme support actif interagissant avec les cellules dès les phases précoces de culture cellulaire (Figure 5 c).



*Figure 5 :* Principales approches de l'ingénierie tissulaire du cœur(97).

Une autre approche originale, celle « **des feuilles de cellules** » est fondée sur l'utilisation de matrices biodégradables uniquement pendant la phase de culture cellulaire. Cette technique implique l'ensemencement des cellules d'intérêt sur des polymères de fibrine (115) et le produit qui en résulte après la période de culture est constitué exclusivement de cellules (Figure 5 c). Des progrès plus récents ont permis de cultiver les cellules sur des polymères de poly(N-isopropylacrylamide) thermosensibles. Ce polymère a en effet la propriété d'être un bon solvant dans l'eau à des températures inférieures à 32 °C et un mauvais solvant pour des températures supérieures. La culture cellulaire se fait à 37 °C et lors de l'abaissement de la température à 20 °C, le gonflement du polymère permet au film de cellules de se détacher (116,117). La cohésion des cellules entre-elles étant assurée par la matrice extracellulaire qu'elles ont secrétée pendant la phase de culture. L'équipe japonaise qui a mis au point cette technique a montré que plusieurs types cellulaires prolifèrent et adhèrent à ces surfaces à 37 °C (118–120). Ces feuilles de cellules une fois greffées sur le cœur ont une capacité d'intégration électromécanique dans le tissu receveur et, en fonction du type cellulaire greffé, des propriétés contractiles leur permettant de communiquer avec les cellules du tissu hôte (116). Sur des modèles de cardiopathie ischémique, ces feuilles de cellules ont

ainsi fait la preuve de leur efficacité fonctionnelle qui paraît supérieure à celle des injections intra-myocardiques conventionnelles. Cette amélioration est associée à une réduction de la zone de la fibrose, à une réorganisation des protéines du cytosquelette et à une production plus importante de cytokines cardio-protectrices (VEGF, HGF) (121,122).

Un autre concept particulièrement séduisant consiste en la fabrication d'une matrice poreuse par **électrospinning**. Cette approche permet de produire des fibres ultra-fines pour favoriser l'infiltration des cellules greffées et leur migration (123,124). L'équipe de Schlatter a développé la construction de nanofibres de polymères semi-conducteurs, un nouveau procédé d'électrospinning particulièrement adapté à ce type de matériau. Les polymères semi-conducteurs ainsi formés sont peu solubles dans des solvants conventionnels et de faible toxicité. Le procédé est basé sur l'électrospinning coaxial permettant l'obtention de nanofibres de poly (9,9-dioctylfluorene) (PFO) de structure compatible avec le cœur.

Le tissu receveur peut également être manipulé préalablement à l'implantation des cellules souches. Il peut être préparé pour transmettre certaines informations chimiques, géniques ou spatiales entrappées dans **des nanofibres** ou via des stratégies de « homing » (125) (SDF-1 (126) ou IGF-1 (127)).

## **VII. Objectifs et organisation du travail :**

Lors de ce projet de thèse nous avons affiné les méthodes de thérapie cellulaire en greffant différents types cellulaires sur différentes matrices biologiques dans un modèle d'ischémie myocardique chez le rat afin d'assurer une meilleure fonction du cœur.

- Un des objectifs de ce travail a été de comparer les effets de la couverture épicaudique via des biomatériaux cellularisés par rapport aux injections conventionnelles de cellules.

- Après avoir montré l'effet bénéfique des biomatériaux cellularisés, nous avons essayé de caractériser les modifications subies par les cellules cultivées sur ces biomatériaux *in vitro* avant d'en tester les effets *in vivo*.

- Enfin, dans une perspective de régénération optimale du myocarde, nous avons

essayé d'évaluer les effets d'une co-transplantation des cellules progénitrices cardiaques dérivées de cellules souches embryonnaires avec des CSM susceptibles d'apporter un soutien trophique, les deux populations cellulaires étant délivrées au cœur via une matrice biodégradable.

## **Matériels et méthodes**

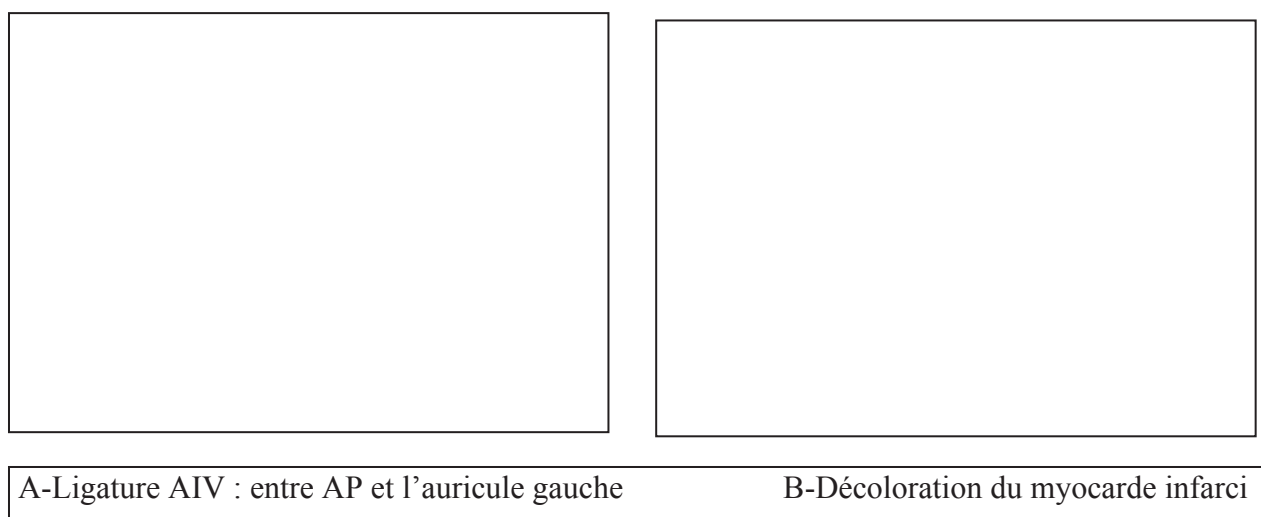


## I. Modèles expérimentaux *in vivo* :

Toutes les expériences se sont déroulées selon « les principes de soins aux animaux de laboratoire » formulés par la Société Nationale pour la Recherche Médicale et selon le guide pour les soins et l'utilisation d'animaux de laboratoire » préparé par l'« Institut des Ressources des Animaux de Laboratoire », la « Commission de Sciences de la Vie », le « Conseil National de la Recherche », et publié par la « National Academy Press », révisé en 1996.

### A. Modèle chirurgical d'infarctus du myocarde :

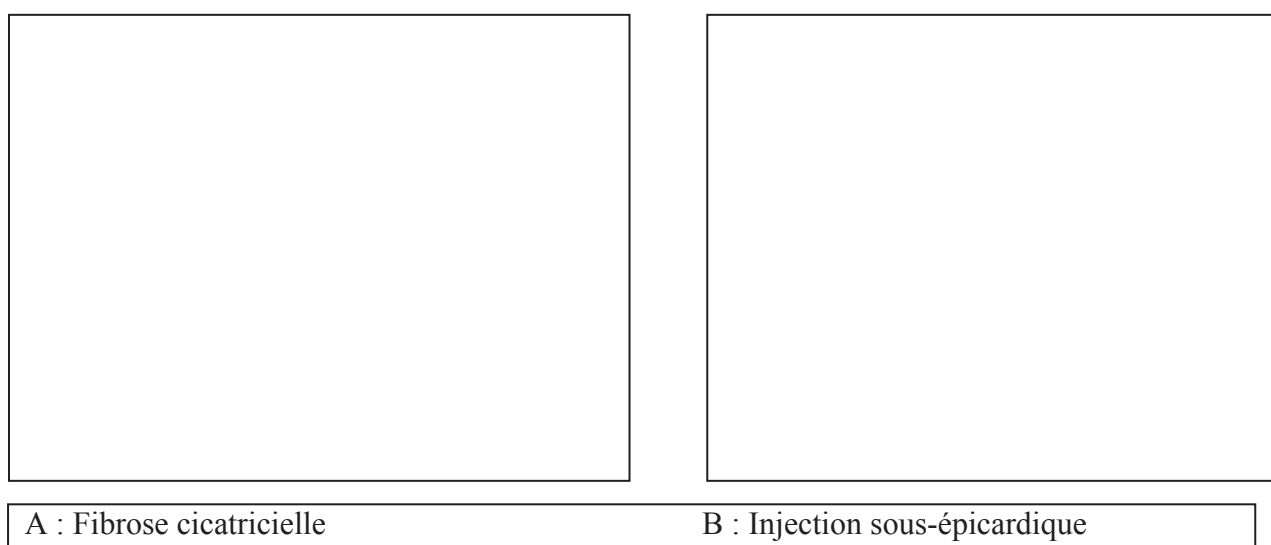
Le modèle animal retenu pour cette étude est le rat Wistar d'environ 200-250g (Charles River, France). L'analgésie des rats (profenid 10 mg/kg en sous-cutané) et leur anesthésie (isoflurane inhalé ; 1 à 3% (Forene, Abbott, UK) dans une cuve à évaporation (Minerve équipement vétérinaire, France) sous un flux d'oxygène de 2 à 3 l/min sont pratiqués selon les recommandations du « Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation du Conseil Canadien de Protection des Animaux » (CCPA). Les animaux sont opérés par thoracotomie gauche dans le 4<sup>ème</sup> espace intercostal et l'infarctus est créé par une ligature permanente de l'artère interventriculaire antérieure (AIV) située entre l'artère pulmonaire (AP) et l'oreillette gauche avec un fil de polypropylène 5/0 (Ethicon, Inc, Somerville, NJ) (Figure 6).



**Figure 6 :** Modèle d'infarctus du myocarde. A) La ligature de l'artère interventriculaire antérieure (AIV) est réalisée entre l'artère pulmonaire et l'auricule gauche. B) La zone infarctée est visualisée par le blanchiment du myocarde.

## B. Greffes :

Un mois après la ligature coronaire, les animaux sont anesthésiés selon le protocole décrit ci-dessus en vue d'une échocardiographie transthoracique (ETT) initiale. Les rats sont ensuite réopérés par tirage au sort en vue des greffes suivant le même protocole d'analgésie et d'anesthésie par sternotomie médiane sur le tiers inférieur du sternum. Ils reçoivent soit des injections sous péricardiques des cellules soit une couverture épicaudique par un biomatériau cellularisé. A l'aide d'une aiguille de 29 G (myjector 100 UI insuline, Terumo), 3 injections (contenant des cellules ou du milieu de culture) sont alors réalisées en zone péri lésionnelle (2 injections) et nécrosée (1 injection). Concernant la couverture épicaudique, le biomatériau cellularisé est appliqué directement sur la zone infarctée du myocarde. Selon la nature du biomatériau utilisé, le dépôt épicaudique peut être suivi de quelques points de suture ou non. La fermeture du sternum est réalisée plan par plan par des points séparés de fil vicryl 3/0 et le pneumothorax est exsufflé.



*Figure 7 :* Greffe des cellules. Après stérnotomie la zone de fibrose est repérée par le blanchissement de la cicatrice.

## C. Constitution des groupes :

### 1. Etude 1 : Comparaison entre les effets de la couverture épiscopordique via des biomatériaux cellularisés par rapport à ceux des injections conventionnelles de cellules (myoblastes squelettiques) :

Quarante rats utilisés pour ce protocole sont traités par la ciclosporine (Néoral, Aventis) à la dose de 10 mg/kg/j en intramusculaire à partir du jour de la greffe. Un mois après la réalisation de l'infarctus du myocarde, les animaux sélectionnés sur la base d'une fraction d'éjection (FE) comprise entre 20% et 45%, déterminée par échocardiographique sont répartis, après tirage au sort, en 4 groupes de 10 rats : injections de milieu de culture (groupe contrôle) ; injections de myoblastes seuls ( $5 \times 10^6$  cellules) ; myoblastes incorporés dans une matrice de gélatine (GELFOAM®, environ  $3.10^6$  cellules) ou cultivés sous forme d'une feuille (environ  $2.10^6$  cellules). Chez tous les rats, après 4 semaines des greffes, une évaluation fonctionnelle est réalisée par échographie, suivie du sacrifice et de l'étude histologique comme le montre le Tableau 3 ci-dessous.

Groupes	Myoblastes	Contrôle	GELFOAM®	Feuilles de myoblastes
Nombre de rats	10	10	10	10
J0	Modèle d'infarctus par occlusion coronaire permanente			
Après 4 semaines	Première évaluation échocardiographique (écho 1)			
	Injection de		Transplantation de	
	Myoblastes ( $5.10^6$ )	Milieu de culture	Patches de GELFOAM® cellularisés	Feuilles de myoblastes
Après 8 semaines	Deuxième évaluation échocardiographique (écho 2) Sacrifices			

*Tableau 3 :Récapitulatif du 1<sup>er</sup> protocole in vivo*

## 2. Etude 2 : Caractérisation des feuilles de cellules et optimisation de leur utilisation *in vivo* (cellules stromales du tissu adipeux) :

Sur les 82 rats Wistar utilisés pour cette étude, seuls 44 ont survécu et ont été répartis, après tirage au sort, en 3 groupes : 1) le groupe 1 est un groupe contrôle (injections de PBS) ; 2) le groupe 2 reçoit des injections de cellules souches adipeuses (ADSC), avec un volume de l'injectat de 100, 120 ou 150  $\mu$ l ; 3) le groupe 3 est greffé avec trois feuilles de cellules ADSC superposées ( $3,5 \cdot 10^6$  cellules/feuille), soit un dépôt d'environ 10 millions de cellules par rat. Tous les animaux sont traités par ciclosporine à la dose de 10 mg/kg/j en intramusculaire à partir du jour de la greffe.

Il faut noter que parmi les 44 rats greffés, 4 rats ont reçu des injections de cellules ADSC marquées à la eGFP et 6 rats ont reçu des feuilles cultivées à partir de cellules ADSC eGFP positives. Le protocole expérimental est résumé dans le Tableau 4.

Groupe	Injection d'ADSC	Contrôle	Feuilles d'ADSC
Nombre de rats	15	14	15
J0	Modèle d'infarctus par occlusion coronaire permanente		
Après 4 semaines	Première évaluation échocardiographique (écho 1)		
	Injection de		Transplantation de feuilles d'ADSC
	ADSC (10.10 <sup>6</sup> )	PBS	
Après 12 semaines	Deuxième évaluation échocardiographique (écho 2) Sacrifices		

*Tableau 4 :Récapitulatif du 2<sup>ème</sup> protocole in vivo*

## 3. Etude 3 : Evaluation à long terme d'un patch composite (cellules stromales du tissu adipeux + progéniteurs cardiaques dérivés de cellules souches embryonnaires humaines) dans un modèle d'infarctus du myocarde :

Les 55 rats wistar utilisés pour cette étude dont 37 seulement ont survécu ont été sacrifiés après 4, 8 ou 24 semaines post-greffe. Tous les rats ont été répartis, après

tirage au sort, en 2 groupes : i) Le groupe contrôle a reçu le patch de GELFILM™ seul (19 rats) et ii) Le groupe traité a reçu le patch GELFILM™ composite (patches co-ensemencés avec les progéniteurs cardiaques CD15+/cellules stromales adipeuses ADSC autologues) (18 rats). Une évaluation fonctionnelle a été réalisée tous les mois par échocardiographie (Tableau 5).

Groupes	Groupe Contrôle	Groupe Traité
Nombre de rats	19	18
J0	Modèle d'infarctus par occlusion coronaire permanente	
Après 4 semaines	Première évaluation échocardiographique (écho 1)	
	<b>Greffes de patch</b>	
	<b>GELFILM™ seul</b>	<b>GELFILM™ composite</b>
Après 8 semaines	Deuxième évaluation échocardiographique (écho 2) Sacrifices de 8 rats traités et 4 rats contrôles	
Après 12 semaines	Troisième évaluation échocardiographique (écho 3) Sacrifices de 7 rats traités et 8 rats contrôles	
Après 28 semaines	Dernière évaluation échocardiographique (écho 7) Sacrifices de 3 rats traités et 7 rats contrôles	

*Tableau 5 :Récapitulatif du 3<sup>ème</sup> protocole *in vivo**

Une immunosuppression par la ciclosporine pour tous les groupes est débutée à partir du jour de la greffe par l'intermédiaire d'une micro-pompe osmotique placée en sous-cutané. Elle permet de délivrer la ciclosporine à une dose journalière de 5 mg/kg avec des taux sanguins cibles de l'ordre de 100 ng/ml.

#### **D. Modèle chirurgical de sacrifice :**

Le sacrifice des rats est réalisé comme précédemment pour l'analgésie, l'anesthésie et la sternotomie. Une dissection du cœur est ensuite pratiquée et les vaisseaux de la base du cœur sont clampés, puis le cœur est excisé et coupé en deux parties (base et apex). Après enrobage avec une solution cryoprotectrice (OTC, Tissutec) les pièces sont

congelées à – 180 °C dans l'azote liquide et conservées immédiatement dans un congélateur à – 80 °C.

Des coupes de 8 µm (180/cœur) sont réalisées à l'aide d'un cryostat Leica (LM 1850, Leica microsysteme SA). Certains cœurs entiers sont dédiés à l'analyse en PCR et sont conservés dans des tubes stériles dans un congélateur à – 80 °C.

## **II. Culture cellulaire :**

### **A. Culture cellulaire à partir de myoblastes :**

#### **1. Culture, préparation et évaluation des populations de myoblastes:**

Les myoblastes humains utilisés pour ce projet proviennent du laboratoire de thérapie cellulaire de l'hôpital Saint Louis.

##### **1.1. Préparation des myoblastes :**

Les myoblastes de donneurs sains sont préparés à partir de biopsies récupérées au cours d'opérations orthopédiques après approbation des établissements concernés selon le protocole établi précédemment (6). Brièvement, après digestion des biopsies par la collagénase IA (1,5 mg/ml, Sigma Chemical Company), les cellules sont cultivées dans un milieu de culture composé de 79% de milieu Myo1, 20% de sérum bovin fœtal (SBF), 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco/BRL) à la dose de 10,7 unités/l et 10,4 g/l, respectivement, 5 ng/ml de basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (Sigma) et 10 nM de dexaméthasone (Sigma) dans un incubateur (37 °C, 80% d'humidité et 5% de CO<sub>2</sub>).

Un stock homogène de cellules est constitué après amplification jusqu'au 5<sup>ème</sup> passage. Il est alors conservé à – 80 °C pendant 24 heures, puis dans l'azote liquide jusqu'à son utilisation.

##### **1.2. Evaluation des populations de myoblastes :**

L'évaluation du pourcentage de myogénicité de chaque préparation est déterminée en calculant le pourcentage de cellules exprimant la desmine (clone 33, 1/100 ; DAKO), marqueur spécifique des myoblastes et des cellules musculaires

différenciées. Le minimum de myogénicité retenu pour les expérimentations de greffe chez le rat est de 80%.

## **2. Culture de myoblastes dans une matrice de gélatine:**

Afin d'évaluer le bénéfice potentiel d'une matrice de GELFOAM® (Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, MI) constituée de gélatine (collagène dénaturé) d'origine porcine, nous avons procédé à l'évaluation de la survie des myoblastes en culture au sein de cette matrice. Celle-ci est découpée en petites pièces de 2,5 x 1,0 x 1,0 cm qui sont ensuite hydratées avec du PBS pendant 30 min à 37 °C. Des myoblastes décongelés (37 °C) sont comptés sur une cellule de Malassez. Quatre-vingt mille cellules par patch sontensemencées et incubées pendant 3 heures dans les conditions précitées. Les patches sont ensuite placés dans du milieu complet qui est changé toutes les 48-72 heures pendant 3 semaines.

Des matrices de GELFOAM®ensemencées ont été congelées après trois semaines de culture et des coupes au cryostat ont été effectuées afin d'évaluer la population de myoblastes au sein de la matrice grâce à un marquage anti-desmine (clone 33, 1/100, DAKO) et/ou un marquage anti-lamine A/C (1/300, Novocastra) dirigé contre les cellules humaines.

L'évaluation de la survie et de la prolifération des cellules au sein du patch a été réalisée par coloration au bleu de trypan à différentes périodes des cultures cellulaires. La digestion des patches de collagène a été réalisée par la collagénase I (Sigma, Type 1) (0,5 mg/ml, 5 à 10 min, 37 °C).

## **3. Culture cellulaire sous forme de feuilles de myoblastes :**

### **3.1. L'ensemencement des myoblastes:**

La formation de feuilles de myoblastes repose sur l'ensemencement des cellules sur une surface coatée avec de la fibrine biodégradable selon le protocole décrit précédemment [24]. Brièvement, 300 µL par boîte de culture de 35 mm (Corning) d'une

solution constituée de fibrinogène humain (90 mg), de thrombine (4 U), d'aprotinine (3000 U) et de chlorure de calcium (3,52 mg) est incubée pendant 2 heures à température ambiante. L'ensemencement des myoblastes (62 500 cellules/cm<sup>2</sup>) est effectué dans 2,6 ml de milieu complet et incubé (37 °C, 80% d'humidité et 5% de CO<sub>2</sub>). Le milieu est changé toutes les 48 à 72 heures et les feuilles de cellules sont obtenues 9 jours plus tard à la suite d'une dégradation progressive de la fibrine par des protéases sécrétées par les myoblastes eux-mêmes.

Des feuilles de myoblastes ont été réservées pour évaluer la viabilité des cellules par le bleu de trypan à 5 temps différents (0, 15, 30, 60 et 120 minutes). D'autres feuilles ont été fixées au méthanol froid (- 20 °C) pendant 10 minutes pour évaluer la présence des cellules myogéniques par immunomarquage anti-Desmine (clone 33, 1/100, DAKO) ainsi que la prolifération des cellules par Ki-67 (1:30; Abcam) aux jours 1 (témoin négatif), 9 et 21.

## **B. Culture cellulaire à partir de cellules souches adipeuses (ADSC):**

### **1. Culture des ADSC :**

Les cellules ADSC (Adipose Derived Stromal/Stem Cells) autologues proviennent du laboratoire de « Neurobiologie, plasticité tissulaire et métabolisme énergétique » de Toulouse. Ces cellules sont prélevées à partir du tissu adipeux sous-cutané inguinal au moment de la réalisation de l'infarctus du myocarde. Après digestion enzymatique à la collagénase, les adipocytes matures sont séparés par centrifugation à partir de la fraction vasculaire (SVF, Stroma Vascular Fraction). Le culot cellulaire est mis en suspension et les cellules sont ensemencées et cultivées dans du milieu DMEM-F12 (Invitrogen) supplémenté avec 10% de SBF jusqu'à la sub-confluence (11,13).

Après transduction par un lentivecteur de troisième génération exprimant l'ADNc de eGFP (Bivic Vec-torology Platform, IFR150, Toulouse) en utilisant une MOI de 50 (multiplicity of infection, ou nombre de particules infectieuses par cellule), en présence de sulfate de protamine (4 mg/ml, Sigma), la cytométrie en flux a montré qu'au moins 30% des ADSC étaient eGFP-positives.



## **2. Culture des ADSC sous forme de feuilles de cellules :**

Les cellules souches adipeuses sontensemencées sur des boites thermosensibles (UpCell™) à la densité de  $3,5.10^5$  cellules par  $\text{cm}^2$  puis incubées pendant 24 ou 48 h dans du milieu complet en fonction des études in vitro et in vivo. Le détachement des feuilles d'ADSC de leur support se fait de manière spontanée au bout de 30 min à température ambiante. Les feuilles sont lavées avec du PBS et trois feuilles de cellules sont superposées de façon à fournir une triple couche de cellules prête à être greffée sur le myocarde.

## **3. Caractérisation des feuilles d'ADSC:**

### **3.1. Test de formation des colonies « Colony-forming unit » (UFC)f :**

Des cellules ADSC ont été cultivées séparément sur des surfaces de culture thermosensibles (Feuille d'ADSC) ou classiques TPP® (ADSC) pendant 24 h. Les cellules sont ensuite trypsinées puis réensemencées à la densité de 400 cellules/ $25 \text{ cm}^2$  dans du milieu supplémenté avec 10% de SBF. Quatorze jours plus tard, les cellules sont fixées au méthanol froid et colorées avec le May-Grünwald Giemsa (Sigma) afin de compter les colonies.

### **3.2. Tests de différenciation:**

Pendant les tests de différenciation, les cellules ont été réensemencées à une densité de  $1,5.10^4$  cellules/ $\text{cm}^2$ .

#### **-Le test de différenciation vers la voie adipeuse :**

L'induction des cellules arrivées à confluence s'est faite durant 3 jours dans le milieu DMEM-F12 supplémenté avec 10% de FBS, 1 mM de dexaméthasone, 0,5 mM d'isobutyl-méthylxanthine, et 60 mM d'indométhacine. Le même milieu utilisé les 18 jours suivants est exempt d'isobutyl-méthylxanthine et est changé tous les 2 ou 3 jours. Le phénotype adipogénique a été démontré à l'aide d'une coloration Oil Red-O (0,5%). Les cellules qui contiennent des vésicules lipidiques sont positives pour cette coloration et se colorent en rouge intense.

### **-Le test de différenciation ostéogénique :**

L'induction des cellules s'est faite pendant 21 jours dans le milieu DMEM-F12 supplémenté avec 10% de FBS, 0,1 mM de dexaméthasone, 3 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , et 50 mg/ml d'acide ascorbique qui est changé tous les 2 ou 3 jours. Le phénotype ostéogénique a été évalué par une coloration au rouge d'alizarine (40 mM ; pH 4,1, Sigma).

## **C. Co-culture des cellules stromale du tissu adipeux autologue et des cellules cardiaques progénitrices dérivées de cellules souches embryonnaires humaines :**

### **1.Culture des cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) :**

Les cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) utilisées pour ce projet sont issues de la lignée I6 (Technion cell lines) provenant du centre médical d'Haïfa (Dr Itskovitz-Eldor).

Ces cellules ont été obtenues à partir d'un blastocyste créé dans le cadre d'une fécondation *in vitro* après accord des parents donneurs et approbation par le comité institutionnel local. Elles ont pu être importées en France grâce à une autorisation du Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (arrêté du 13/07/05).

La culture cellulaire des CSEh a été assurée par le Dr Michel Pucéat (INSERM U633/GENETHON Evry). Les CSEh sont amplifiées sur fibroblastes dermiques humains dans un milieu de propagation complet (NutriStem) par un passage tous les 3 à 4 jours, avec changement simultané de ce milieu afin d'éviter la confluence des colonies cellulaires et leur différenciation.

La spécification cardiaque est initiée deux jours après la dernière amplification de cellules par changement du milieu de propagation par un milieu de spécification cardiogénique composé de aMEM (MacoPharma) de grade clinique complémenté avec du B27, 50X (Invitrogen), de la BMP-2 (Inductos), un inhibiteur du récepteur du FGF (SU5402 ; Calbiochem, Merck) et de l'albumine humaine (HSA ;Baxter) pour une durée de 4 à 6 jours. Ce processus de spécification a été validé par la mesure d'une expression

de gènes mésodermaux et cardiaques (Tbx6, Mesp1, Nkx2.5, Mef 2C) (Figure 8) par RT-PCR et par la perte d'expression de l'antigène membranaire SSEA-4, marqueur de l'état de non différenciation des cellules.

La séparation de la fraction cardiaque se fait sur colonne immunomagnétique par l'anticorps anti-CD15 (Miltenyi) et permet d'éliminer les cellules non spécifiées et d'obtenir une population purifiée de précurseurs cardiaques.

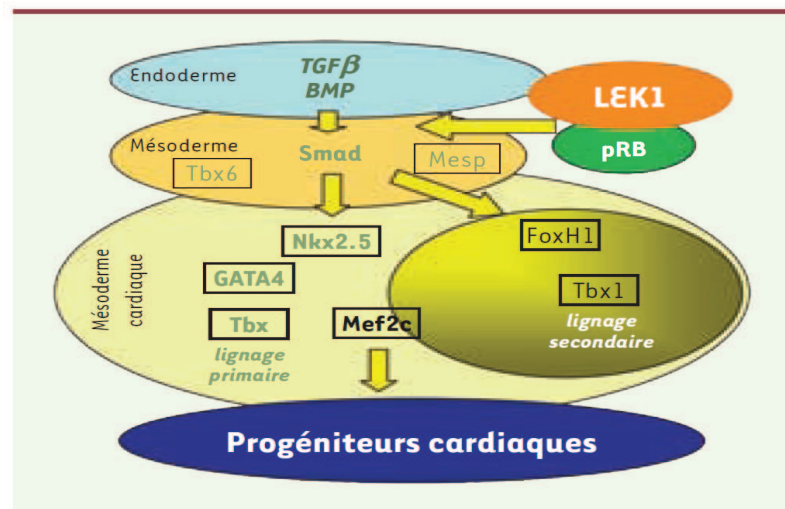
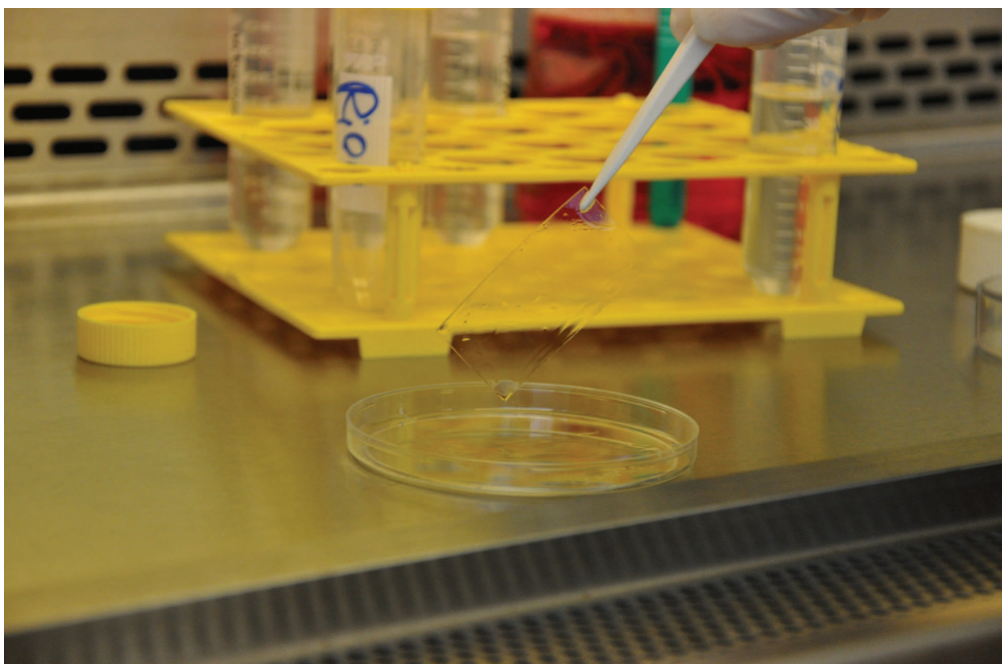


Figure 8 : Réseaux transcriptionnels déterminant le phénotype cardiaque *in vitro* et *in vivo*

## 2. Co-culture des ADSC avec les progéniteurs cardiaques sur la matrice GELFILM™:

Après avoir testé différents biomatériaux (matrice de GELFOAM®, feuille de cellules) notre choix s'est porté sur un film de gélatine porcine (GELFILM™) (Figure 9) pour l'étude de co-culture des cellules progénitrices cardiaques dérivées des CSEh avec les cellules souches mésenchymateuses autologues (ADSC). Les patches de GELFILM™ sont découpés en fragments de 1 cm<sup>2</sup> etensemencés avec 300 000 cellules d'ADSC de rat. Après formation d'un tapis cellulaire sur le patch (3 jours), 300 000 progéniteurs cardiaques humains sont à leur tour déposés. Ces patches composites (ADSC de rat + progéniteurs cardiaques humains) sont récupérés 7 jours après l'ensemencement des progéniteurs afin de réaliser les études *in vitro* et *in vivo*.



*Figure 9 :* Patch de GELFILM™ (5 cm x 2,5 cm x 75 µm) réhydraté juste avant l'ensemencement des cellules.

Des patches ensemencés de cellules ADSC seules ou ADSC + progéniteurs ont été utilisés pour étudier la viabilité des cellules après 3 jours de culture (ADSC seules) ou après 10 jours (ADSC + progéniteurs). Après traitement à la Trypsine-EDTA 0,05% , les cellules sont comptées au microscope sur cellule de Malassez.

D'autres patches cellularisés ont été utilisés pour quantifier le nombre de cellules à l'aide de PCR en temps réel 1) à partir d'ADSC seules (après 3 jours de culture) grâce aux amorces de 18S (18S-BR5 :CCCTGCCCTTTGTACACACC ;18S-SC : CGATCCGAGGGCCTCACTA) et 2) à partir des co-cultures (après 10 jours) à l'aide d'un kit « The Quantifiler Human DNA » qui repose sur l'utilisation de deux amorces de gènes spécifiques humains « hTERT » et qui permettent de quantifier l'ADN humain.

Des patches ensemencés avec les cellules ADSC ont été utilisés pour évaluer la présence de cellules de rat par le DAPI à 5 mg/ml (4',6 diamidino-2-phenylindole) pendant 3 minutes (Molecular Probes). Les marquages réalisés sur les patches composites ont permis d'évaluer la présence des progéniteurs cardiaques grâce aux anticorps cardiaques : anti-CD15 (NOVOCASTRA, 1/50), anti-Nkx2.5 (RD System, 1/50) et anti-Tbx5 (Abcam, 1/500) et à l'anticorps anti-Lamine A/C (NOVOCASTRA, 1/300), spécifique des noyaux humains.

### **III. Critères d'évaluation:**

#### **A. Evaluation fonctionnelle par échographie transthoracique (ETT) :**

L'évaluation échocardiographique est réalisée en aveugle par un même opérateur sur l'appareil d'échocardiographie Sequoia 516 (Siemens ; Acuson Corp, Mountain Valley, USA). Après l'anesthésie des rats, l'examen est réalisé grâce à une sonde linéaire (15L8) de haute fréquence (13 à 15 MHz) et un gel de contact.

Tous les paramètres mesurés (Volume Télédiastolique VTD, Volume Télésystolique VTS, Fraction d'Ejection FE et Fraction de Raccourcissement FR) stockés sur disque optique numérique sont comparés au sein de chaque groupe (post-greffe vs pré-greffe) et entre les groupes. Les variables prises en compte sont les variations des 4 paramètres mentionnés ci-dessus, exprimées en valeurs absolues [différence (post-greffe –pré-greffe)] et en valeurs relatives [différence (post-greffe – pré-greffe/pré-greffe)]. Toutes les mesures sont moyennées sur au moins deux cycles cardiaques consécutifs.

#### **B. Evaluation histologique :**

##### **1. Colorations de type Eosine-Hématoxyline :**

Cette coloration a permis de repérer la zone de l'infarctus et de rechercher tout infiltrat de cellules inflammatoires ou néoplasiques.

##### **2. Coloration de type Rouge Sirius :**

La coloration Rouge Siruis (0,1% dans l'acide picrique) a servi pour évaluer la zone de fibrose quantifiée ultérieurement par analyse informatisée à l'aide du logiciel MetaMorph 7.5 (Molecular Devices) à partir des images obtenues à grossissement 10X au microscope optique.

## C. Evaluation immunohistochimique:

18 coupes par rat sont immunomarquées par chacun des anticorps récapitulés dans le Tableau 6. Chaque marquage en Immunofluorescence a été accompagné par un marquage secondaire au DAPI (Sigma, 50 ng/ml).

Types de marqueurs	Antigène	Spécificité de l'espèce	Commentaires	Espèces	Dilution	Fournisseur
Cellules humaines	Lamine A/C	Humain	Noyaux des cellules humaines	Souris	1/300	Novocastra
Cellules transduites	GFP		Détecter les cellules greffées transduites à la GFP	Lapin	1/800	Invitrogen
Cellules musculaires	Desmine	Humain/Souris	Cellules musculaires différenciées (fibres musculaires) ou non (myoblastes)	Souris	1/100	Daco
	My32	Humain	La chaîne lourde de myosine	Souris	1/200	Sigma
Cellules stromales	CD90	Rat	Cellules d'origine adipeuse	Souris	1/200	BD Sciences
	CD73	Rat	Cellules d'origine adipeuse	Souris	1/200	BD Sciences
Cellules cardiaques	$\alpha$ -actinine	Rat/Humain	Marqueur cardiaque tardif	Souris	1/300	Invitrogen
	Nkx2.5	Humain	Marqueur cardiaque précoce	Souris	1/50	RD system
	CD15	Humain	Marqueur cardiaque précoce	Souris	1/50	Millipore
	Tbx5	Humain	Marqueur cardiaque précoce	Lapin	1/500	Abcam
Cellules souches	C-Kit	Rat/Humain	Cellules souches endogènes	Lapin	1/100	Daco
Cellules endothéliales	RECA	Rat	Marqueurs des vaisseaux sanguins	Souris	1/50	Serotec
Macrophages	CD68	Rat	Monocytes/Macrophages	Souris	1/100	AbDSerotec
	ED2	Rat	Macrophage M2	Souris	1/50	AbDSerotec
	NOSi	Rat	Macrophage M1	Lapin	1/100	BD Sciences

*Tableau 6 :* Tableau récapitulatif des principaux anticorps primaires utilisés *in vivo*.

## D. Biologie moléculaire:

### 1. Extraction d'ARN et RT-PCR :

L'ARN total est extrait en utilisant du Trizol (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. Le rendement de l'extraction est mesuré par l'absorbance à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. 1  $\mu$ g de l'ARN total est utilisé lors de la transcription inverse pour synthétiser l'ADN complémentaire sur une machine Thermocycler TC412 (modèle 370/371, réf 95111, Thermo Electron corporation). Une deuxième étape de PCR classique est ajoutée pour amplifier l'ADNc synthétisé précédemment au cours de 35 cycles (1 min de dénaturation à 95 °C, 45 secondes d'hybridation à 60 °C et 1 min d'élongation à 72 °C).

## 2. PCR en temps réel:

Les PCR quantitatives ont été réalisées avec un thermocycleur/détecteur de fluorescence (Roche, light cycler 480), relié à une unité informatique permettant le stockage des données grâce à un logiciel spécifique. La PCR quantitative repose sur l'utilisation d'une molécule intercalante SYBRGreen qui n'émet de la fluorescence que lorsqu'elle s'incorpore dans de l'ADN double brin en cours de polymérisation. Un rayon laser excite la molécule intercalante et la fluorescence émise est captée par un spectrographe relié à une caméra CCD (Charge-Coupled Device). Les principales amorces utilisées sont résumées dans le Tableau 7 ci-dessous.

Gènes	Séquences (5'...3')
F-huGAPDH	ATGGGCAAGGTGAAGGTCGGAG
R-huGAPDH	TCGCCCAGACTTGATTTTGCAGG
F-VEGF-A	TCACCAAAGCCAGCACATAG
R-VEGF-A	TTGACCCTTTCCCTTTCTCCTC
F-HGF	TATTTACGGCTGGGGCTACA
R-HGF	ACGACCAGGAACAATGACAC
F-TIMP1	TCCCTTGCAAAGTGGAGAGT
R-TIMP1	GTCATCGAGACCCCAAGGTA
F-Itga2	CTTGGTAGGTGCTCCCATGT
R-Itga2	GCCATCCATGTTGATGTCTG
F-Emilin1	AGCGGACGTAGAGGTTCTGA
R-Emilin1	CCAGGCCAGTTCTTCTCTTG
18S-BR5	CCCTGCCCTTTGTACACACC
18S-SC	CGATCCGAGGGCCTCACTA

*Tableau 7 : Récapitulatif des principales amorces utilisées*

## 3. RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array:

C'est une méthode qui permet de révéler l'expression de 84 gènes impliqués dans la formation de la matrice extracellulaire. Le système contient des gènes de structure de la matrice extracellulaire, des gènes de molécules d'adhésion et des protéases impliqués dans le remodelage de la matrice ainsi que ceux de leurs inhibiteurs. 0,5 µg d'ARN extrait à partir des échantillons cellulaires a servi pour l'étape de la transcription reverse par le RT<sup>2</sup> First Strand Kit. L'étape de l'amplification de l'ADNc par RT-PCR a été menée à l'aide du kit RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array en utilisant la méthode SYBRGreen via le Light Cycler 480 system (Roche Diagnostics).



## **E. Immunotransfert:**

Les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide Gel Electrophoresis) dans un tampon Tris- glycine-0,1% SDS sous ampérage constant (35 à 40 mA pour un gel de 50 ml). Après migration des protéines sur le gel en milieu dénaturant, elles sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Porablot) sous un courant constant de 200 mA pendant 1 heure dans un tampon (20 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, pH 7,5, 10% éthanol (v/v)). La saturation des sites non spécifiques de la membrane durant 1 h à 4 °C est effectuée dans le tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,5, 150 mM NaCl, additionné de 5% de lait en poudre ou 5% SAB-IgGfree). L'incubation de la membrane avec l'anticorps primaire spécifique se fait une nuit à 4 °C dans le tampon Tris-HCl (50 mM, pH 7,5, 150 mM NaCl, Tween-20 0,1% additionné de 1% de SAB-IgGfree (Sigma)). La membrane est ensuite incubée pendant 1 h à température ambiante avec le second anticorps couplé à la peroxydase dans le même tampon. La révélation de l'activité de la peroxydase couplée aux anticorps secondaires est réalisée par chimioluminescence en utilisant le Kit "SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate" (Pierce, Rockford, USA).

## **IV. Analyse statistique :**

L'analyse statistique est assurée par deux statisticiennes indépendantes 1) Séverine Peyrard (Centre d'Investigations Cliniques et Unité de Recherche Clinique de l'hôpital Européen Georges Pompidou) et 2) Marie-Cécile Perrier (Centre de recherche cardiovasculaire).

Le seuil de significativité des tests est de 0,05 et les analyses statistiques sont effectuées avec la version 9.1 du logiciel statistique SAS (Cary, NC 27513, États-Unis).

Les changements dans les paramètres de la fonction ventriculaire gauche (Fraction d'éjection FE, Fraction de Raccourcissement FR, Volume Télédiastolique VTD et Volume Télésystolique VTS) sont comparés entre groupes en utilisant une analyse paramétrique de la variance au cours du temps (pré et post-transplantation), et sont exprimés comme des ratios de moyennes géométriques avec leur intervalle de confiance de 95%. Certaines données sont représentées sous forme de moyennes (+/-écart type) ou de médiane (min, max) des valeurs.



Les valeurs de la fibrose et les nombres de vaisseaux par  $\text{mm}^2$  (1512 coupes examinées pour chaque paramètre) sont étudiées en utilisant une analyse paramétrique de covariance en fonction des groupes.

# Résultats

## **I. Comparaison entre les effets de la couverture épicardique via des biomatériaux cellularisés par rapport à ceux des injections conventionnelles de cellules :**

Confère article en Annexe1 : « Cell Delivery: Intramyocardial Injections or Epicardial Deposition? A Head-to-Head Comparison »

Comme il a été développé précédemment dans l'introduction, un des problèmes majeurs de la thérapie cellulaire est la mort des cellules après les injections. Le premier objectif de ce travail a été de trouver un moyen pour transférer les cellules à la zone infarctée du cœur tout en limitant leur mortalité. A partir de l'hypothèse selon laquelle la couverture épicardique par un biomatériau cellularisé pourrait améliorer la rétention cellulaire, la survie des cellules, leur prolifération et donc la fonction du ventricule gauche nous avons voulu tester i) les effets de la greffe d'une matrice de gélatine porcine « GELFOAM® » incorporée par les cellules d'intérêt ii) ainsi que ceux de la greffe des feuilles de cellules cultivées sur des polymères de fibrine.

Pour établir la preuve de ce concept, le type cellulaire retenu a été les myoblastes squelettiques. En plus de l'expérience du laboratoire avec ce type de cellules, les myoblastes sont faciles à obtenir à partir d'une biopsie humaine et leur détection est facile après la greffe.

### **A. Caractérisation des biomatériaux *in vitro* :**

#### **1. Rétention des myoblastes :**

Dans l'optique d'améliorer la survie des myoblastes après la greffe, il était préalablement indispensable de vérifier leur présence et leur prolifération au sein des biomatériaux utilisés *in vitro*.

##### **1.1. Culture cellulaire sur la matrice de GELFOAM® :**

Le nombre de cellules incorporées dans le GELFOAM® a été quantifié après digestion de la matrice par la collagénase et une coloration au bleu de trypan. Les résultats résumés dans le tableau (Tableau 8) ont montré un maximum de prolifération

évalué à une moyenne de  $3.10^6$  myoblastes au bout de trois semaines après ensemencement de quatre-vingt milles cellules au sein du GELFOAM®. C'est presque quatre fois plus que le nombre de cellules obtenues sur un support classique.

	Nombre de myoblastes			
Période	Culture sur support classique (n=3)	Moyenne	Culture dans le GELFOAM®(n=3)	Moyenne
Après 3 jours	135 000	<b>139 200</b>	80 000	<b>85 000</b>
	150 000		90 000	
	132 600		Test desmine (+)	
Après 7 jours	1 244 600	<b>1 075 000</b>	500 000	<b>620 600</b>
	1 071 000		462 000	
	910 000		900 000	
Après 15 jours	1 314 000	<b>1 217 000</b>	2 400 000	<b>2 221 300</b>
	1 100 000		2 064 000	
	Test desmine (+)		2 200 000	
Après 21 jours	1 000 000	<b>800 000</b>	2 160 000	<b>3 067 300</b>
	600 000		4 142 000	
			2 900 000	

*Tableau 8 : Survie et prolifération des myoblastes in vitro*

## 1.2. Culture cellulaire sous forme de feuilles de cellules :

Les feuilles de myoblastes cultivées sur les polymères de fibrine ont entraîné une forte adhésion intercellulaire empêchant le comptage des cellules malgré un traitement à la trypsine. En conséquence, le suivi de la cinétique de prolifération des myoblastes au sein de la feuille a été effectué par un marquage anti-Ki67 qui a montré un pic de prolifération ( $\approx 1.10^6$  myoblastes) après neuf jours de culture cellulaire suivi d'une décline ( $\approx 0,5.10^6$  myoblastes). Afin de remédier à ce faible taux de cellules, deux feuilles de myoblastes ont été superposées l'une sur l'autre avant la transplantation.

## B. Evaluation des greffes *in vivo* :

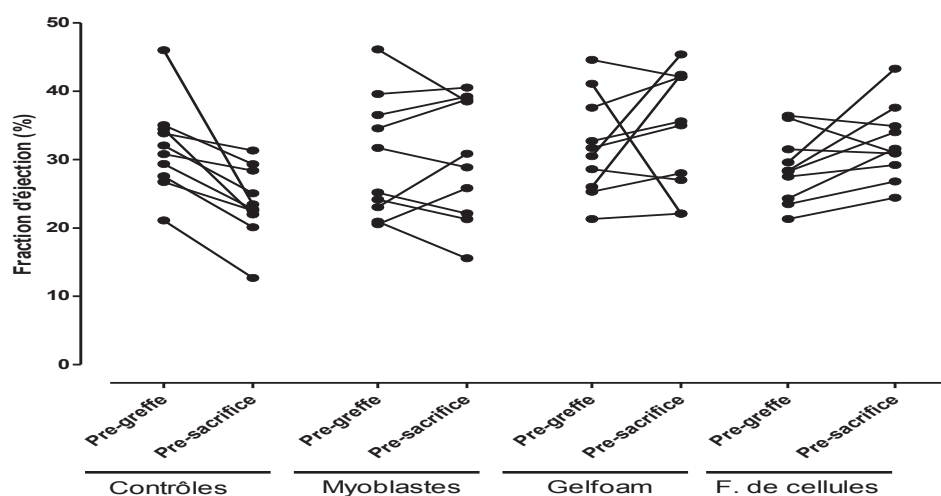
### 1. Analyse fonctionnelle cardiaque :

Le premier critère d'évaluation correspond à l'analyse de l'échocardiographie qui nous a permis de comparer la fonction contractile des cœurs avant et après les greffes. Les critères retenus sont les fractions d'éjection (FE), les volumes télédiastoliques (VTD) et les volumes télésystoliques (VTS). La veille des greffes, les 4 groupes de rats se sont avérés comparables.

Une amélioration significative de la fonction contractile (basée sur la FE) a été observée dans le groupe GELFOAM® puis dans le groupe Feuilles de cellules par rapport au groupe Contrôle ( $p=0,004$ ). En revanche aucune différence significative n'a été observée dans les mesures des VTD et des VTS après traitement. Le tableau ci-dessous résume les tests statistiques utilisés et leurs résultats. Les valeurs des paramètres (FE, VTD, VTS) sont données sous la forme : Moyenne, Valeur max, Valeur min et Ecart-type (Tableau 9 et Figure 10).

Paramètres	Contrôle (n= 10)	Myoblastes (n= 10)	GELFOAM® (n= 10)	F. de cellules (n= 10)
FE base ( % )	31,69 [21,09; 45,99]	30,24 [20,55; 46,12]	31,94 [21,30; 44,60]	28,69 [21,30; 36,40]
FE post greffe ( % )	23,76 [12,69; 31,32]	30,15 [15,55; 40,53]	34,18 [22,10; 45,40]	32,37 [24,40; 43,30]
Variation relative de la FE (%)	-24,37 [-49,02; -7,47]	0,61 [-25,64; 33,79]	10,02 [-46,23; 63,08]	14,35 [-14,13; 46,28]
VTD pré greffe (cm <sup>3</sup> )	0,64 [0,43; 0,95]	0,68 [0,42; 1,03]	0,58 [0,38; 0,85]	0,64 [0,47; 0,83]
VTD post greffe (cm <sup>3</sup> )	0,9 [0,65; 1,18]	0,8 [0,54; 1,07]	0,74 [0,52; 1,01]	0,74 [0,43; 1,01]
VTD (%)	45,22 [-14,88; 126,19]	20,91 [-10,06; 55,22]	30,03 [7,21; 62,06]	16,14 [-7,07; 55,29]
VTS pré greffe (cm <sup>3</sup> )	0,44 [0,23; 0,62]	0,49 [0,23; 0,77]	0,4 [0,21; 0,67]	0,46 [0,33; 0,64]
VTS post greffe (cm <sup>3</sup> )	0,69 [0,47; 0,99]	0,57 [0,32; 0,9]	0,5 [0,33; 0,77]	0,5 [0,27; 0,76]
VTS ( % )	65,31 [1,44; 221,04]	21,72 [-8,04; 65,75]	27,87 [-15,65; 97,76]	10,81 [-24,53; 55,83]

*Tableau 9* : Evaluation de la fonction cardiaque chez les différents groupes de rats



*Figure 10 :* Représentation graphique de l'évolution de la fraction d'éjection (avant et après greffes) dans les différents groupes

## 2. Quantification des myoblastes par RT- PCR après les greffes:

Parmi les sept cœurs réservés dans chaque groupe à la quantification des cellules greffées par RT-PCR, les cellules humaines ont été détectées dans seulement deux cœurs des groupes Myoblastes et Feuille de cellules et dans cinq cœurs du groupe GELFOAM®. Aucune signal n'a été détecté dans le groupe Contrôle. Les concentrations d'ADN quantifiées dans les trois groupes considérés (Myoblastes, GELFOAM® et Feuille de cellules) sont exprimées sous forme de médianes [min, max] (0,00 ng/μl [0,00 ; 2,60], 6,20 ng/μl [0,00 ; 17,40] et 0,00 ng/μl [0,00 ; 88,00]). Ces résultats confirment une survie cellulaire plus importante dans le groupe Feuille de cellules puis dans le groupe GELFOAM® par rapport au groupe Myoblastes (Tableau 10). Ces résultats ont été confirmés par migration sur gel d'agarose.

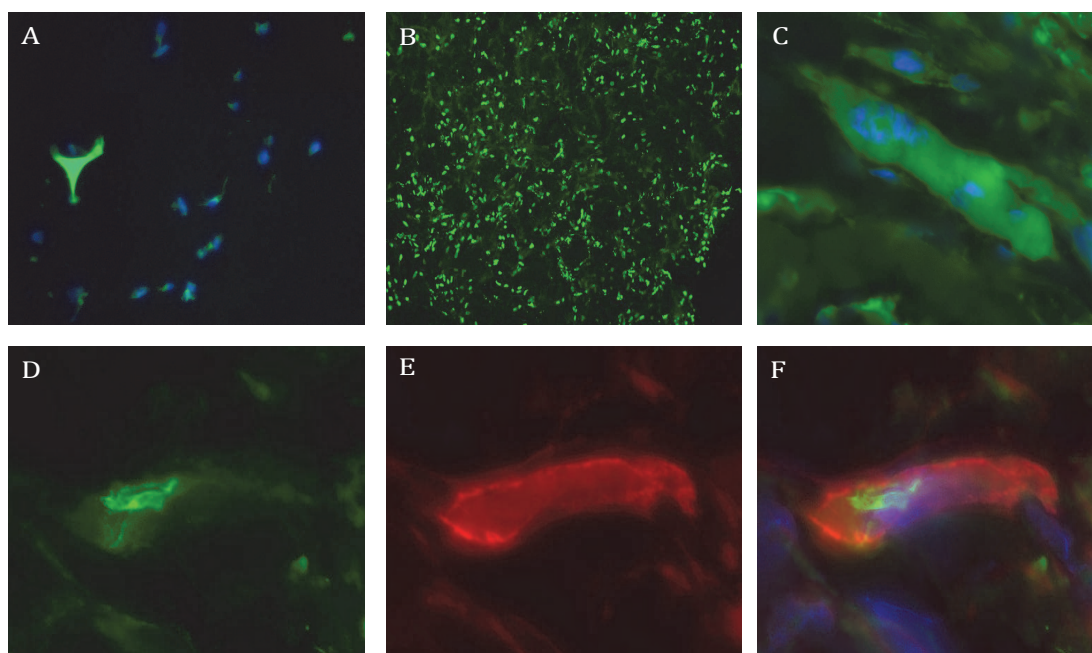
Groupe	PCR Quantitative (ng/μl)	
	n	Moyenne
<b>Feuille de cellules</b>	7	13,81
<b>GELFOAM®</b>	7	7,09
<b>Myoblastes</b>	7	0,37

*Tableau 10 :* Comparaison de la survie cellulaire entre les différents groupes.

### 3. Détection et phénotypage des myoblastes greffés par immunomarquage :

Les immunomarquages (Figure 11) effectués à l'aide des anticorps dirigés contre la lamine A/C, marqueur nucléaire (Figure A, B et D) ou le My32, marqueur de la chaîne lourde de la myosine (Figure C et E) ont confirmé les résultats de la RT-PCR et montré la présence des myoblastes greffés dans les deux groupes de biomatériaux cellularisés un mois après les transplantations. La Figure F montre une cellule doublement marquée avec les deux anticorps cités précédemment.

En revanche, toutes les cellules détectées restent collées soit à la matrice sur laquelle elles étaient ensemencées soit à la surface du cœur et nous n'avons observé aucune cellule ayant migré dans le myocarde.



*Figure 11* : Marquage des cellules greffées au sein de la matrice GELFOAM *in vitro* (A) et *in vivo* (B-F).

### 4. Evaluation de l'angiogénèse et de la fibrose à un mois:

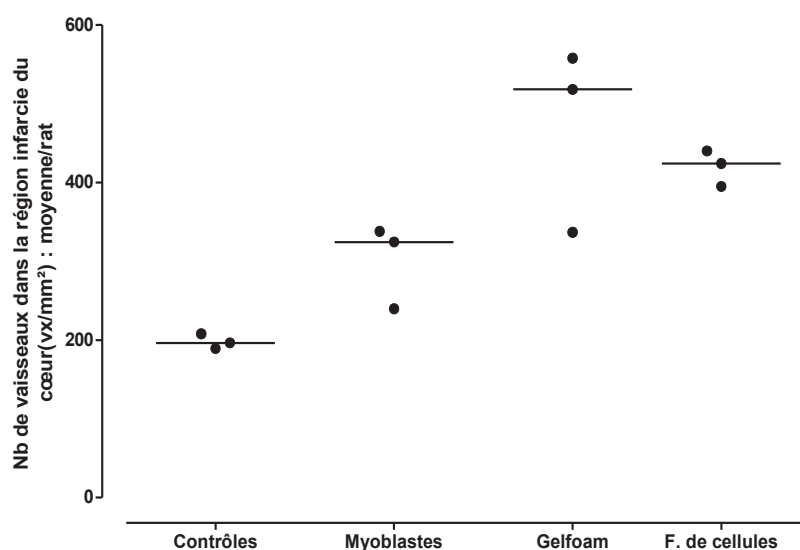
#### 4.1. Angiogénèse :

La quantification des vaisseaux sanguins après immunomaquage à l'aide de l'anticorps anti-RECA (Tableau 11 et Figure 12) montre une amélioration de l'angiogénèse dans les groupes GELFOAM® et Feuille de cellules par rapport aux groupes

Myoblastes et Contrôle (GELFOAM® vs Contrôle :  $p=0,03$ ; Feuilles de cellules vs Contrôle :  $p=0,02$ ).

Groupe	Nombre de vaisseaux dans la région infarctée du cœur (vaisseaux/mm <sup>2</sup> )		
	Moyenne	Min	Max
<b>Contrôle (n=3)</b>	197,78	189,09	207,89
<b>Myoblastes (n=3)</b>	300,58	239,60	337,77
<b>GELFOAM®(n=3)</b>	470,91	336,70	557,83
<b>Feuille de cellules (n=3)</b>	419,70	395,00	440,00

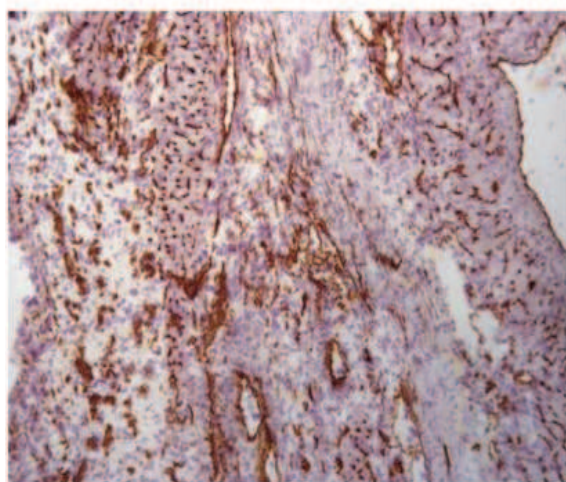
*Tableau 11 :* Comparaison du nombre de vaisseaux néoformés dans les différents groupes



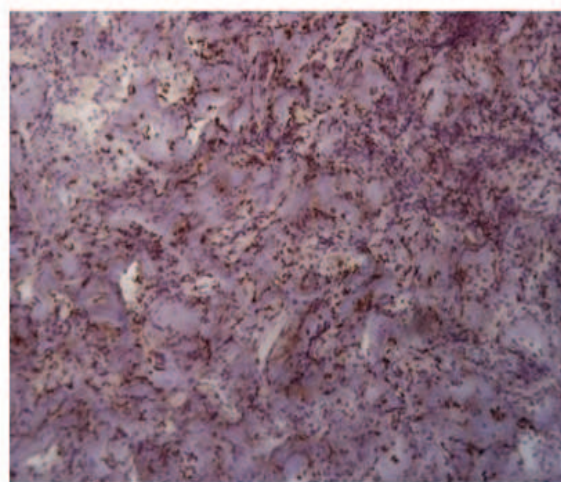
*Figure 12 :* Représentation graphique de l'évaluation de l'angiogénèse dans les différents groupes.

En plus des vaisseaux sanguins néoformés dans la zone infarctée des cœurs du groupe GELFOAM®, une vascularisation importante du patch de GELFOAM® lui même a été observée comme le montre la Figure 13 ci-dessous.





Vaisseaux dans le cœur



Vaisseaux dans le patch de GELFOAM®

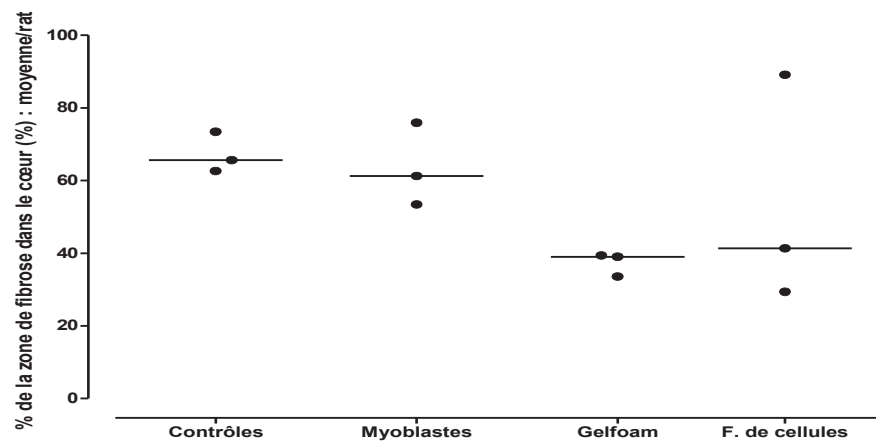
*Figure 13 :* Marquage anti-RECA au niveau du myocarde et au niveau de la matrice chez un rat recevant les myoblastes incorporés dans la matrice GELFOAM®

#### 4.2. Fibrose :

L'analyse des 216 coupes traitées par le Rouge Sirius a permis d'observer une diminution du pourcentage de la zone de fibrose dans les cœurs des groupes GELFOAM® et Feuilles de cellules par rapport aux cœurs des deux autres groupes (Tableau 12 et Figure 14). Toutefois, les valeurs enregistrées ne sont significatives que dans le groupe GELFOAM® par rapport au groupe Contrôle mais aussi par rapport au groupe Myoblastes ( $p=0,04$  ;  $p=0,02$ ), respectivement.

Groupe	Zone de fibrose dans le cœur (%)		
	Moyenne	Min	Max
<b>Contrôle (n= 3)</b>	67,2	62,6	73,4
<b>Myoblastes (n= 3)</b>	63,5	53,4	75,9
<b>GELFOAM®(n= 3)</b>	37,3	33, 6	39,4
<b>Feuille de cellules (n= 3)</b>	53,3	29,4	89,1

*Tableau 12:* Comparaison de la fibrose entre les différents groupes.



*Figure 14 :* Représentation graphique de l'évaluation de la fibrose entre les différents groupes

## II. Caractérisation des feuilles de cellules et optimisation de leur utilisation *in vivo* :

Confère article en Annexe 2 : « Epicardial adipose stem cell sheets results in greater post-infarction survival than intramyocardial injections »

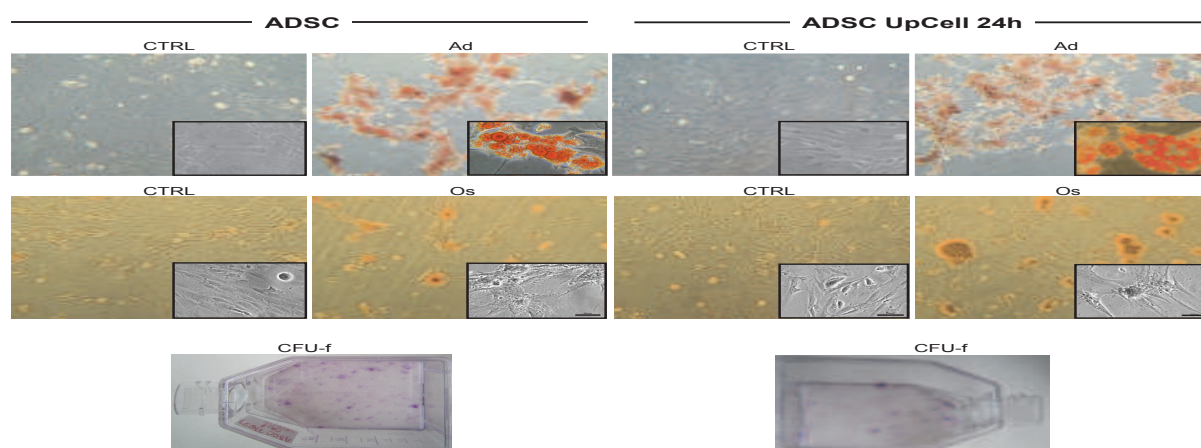
Les bénéfices d'une couverture épocardique par des biomatériaux cellularisés nous a ensuite conduits à tenter d'optimiser la culture de la feuille de cellules avec l'avantage majeur d'être un produit constitué exclusivement de cellules.

Vu le caractère peu migratoire des myoblastes et les résultats enregistrés dans la première étude, nous avons choisi de greffer des cellules mésenchymateuses d'origine adipeuse (ADSC) pour leur potentiel démontré de production de cytokines et de facteurs trophiques.

### A. Caractérisation des feuilles de cellules *in vitro*:

#### 1. Différenciation des ADSC sur support classique ou thermosensible :

Après culture des ADSC sur les deux types de support (support classique et support thermosensible), la formation de clones indépendants issus d'une seule cellule (colony-forming unit fibroblast, CFU-F) a été observée sur les deux surfaces (Figure15).

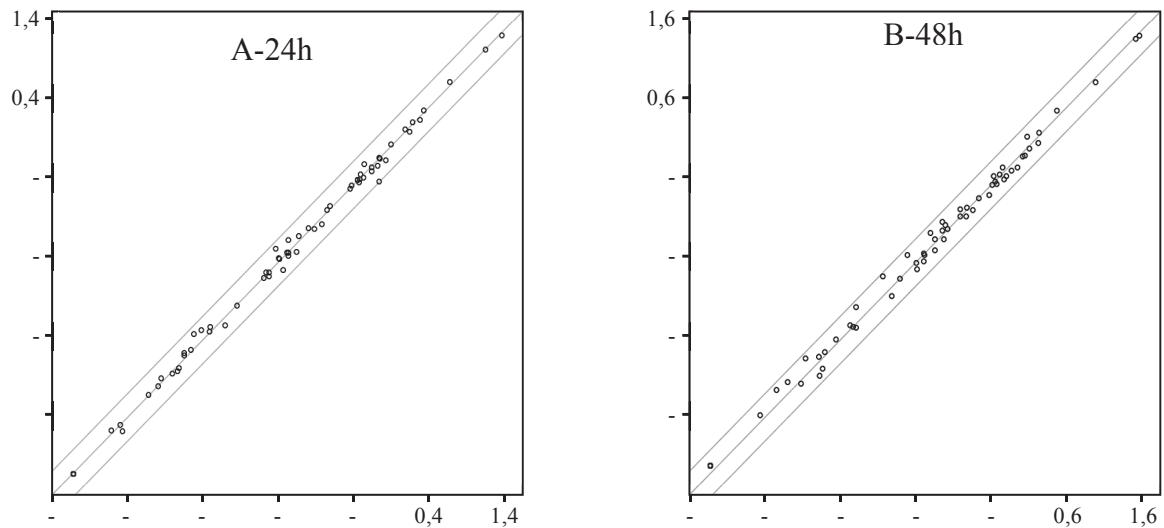


*Figure 15* : Caractérisation de cultures d'ADSC sur le support thermosensible par rapport à un support classique.

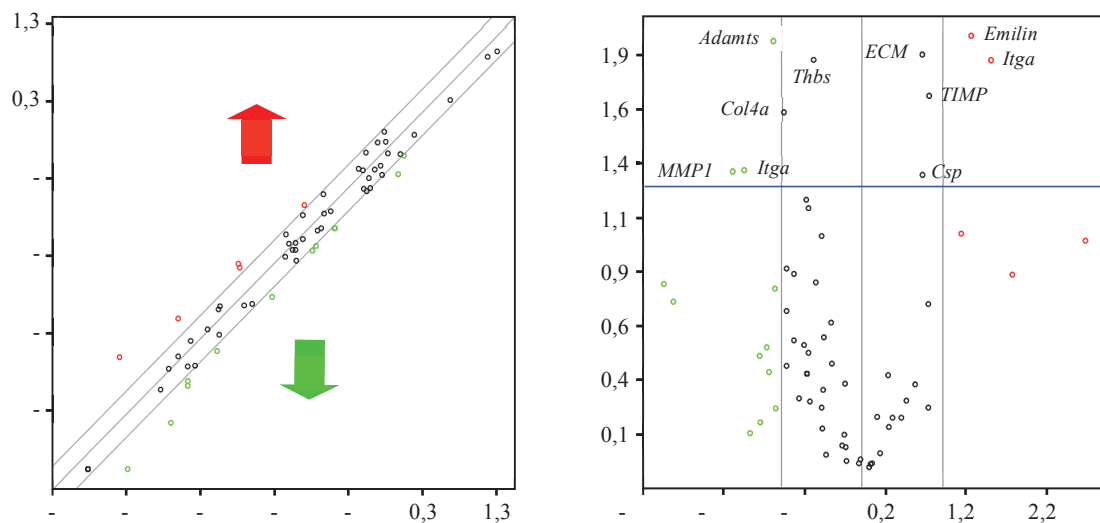
Les ADSC cultivées sur les deux types de support ont gardé leur capacité à former des colonies mais aussi leurs propriétés de se différencier en précurseurs adipocytaires (Ad) ou ostéogéniques (Os).

## **2. Détermination des gènes impliqués dans la formation de la matrice extracellulaire (MEC):**

Afin d'identifier les principaux gènes à l'origine de la formation de la feuille d'ADSC, nous avons utilisé un système de PCR quantitative « RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array » qui permet de révéler l'expression de 84 gènes impliqués dans la formation de la matrice extracellulaire. Ce système a montré qu'il n'y a pas de différence significative dans l'expression de ces gènes quels que soient le support et le temps de culture (24 ou 48h ;Figure 16). La confluence des cellules semble être à l'origine de la formation de la matrice extracellulaire. Cependant, l'expression de certains gènes a significativement augmenté dans les échantillons de cellules cultivées sur le support thermosensible par rapport aux cellules en suspension (Figure 17). Ces résultats nous ont permis de sélectionner 5 gènes impliqués dans la formation de la matrice extracellulaire et qui sont responsables de l'adhésion intercellulaire et de la formation de la feuille de cellules. Il s'agit de l'Integrin alpha2 (Itga2) (p=0.013), l'Elastin microfibril interfacer1 (Emilin1) (p=0.010), le Tissue inhibitor of metalloproteinase1 (Timp1) (p=0.019), la Chondroïtin sulfate proteoglycan2 (Cspg2) (p=0.044), et l'Extracellular matrix protein1 (ECM1) (p=0.012).



*Figure 16 :* Comparaison de l'expression des gènes de la MEC entre une culture des ADSC sur boîte thermosensible par rapport à une culture des ADSC sur support classique pendant 24h (A) et 48h (B).

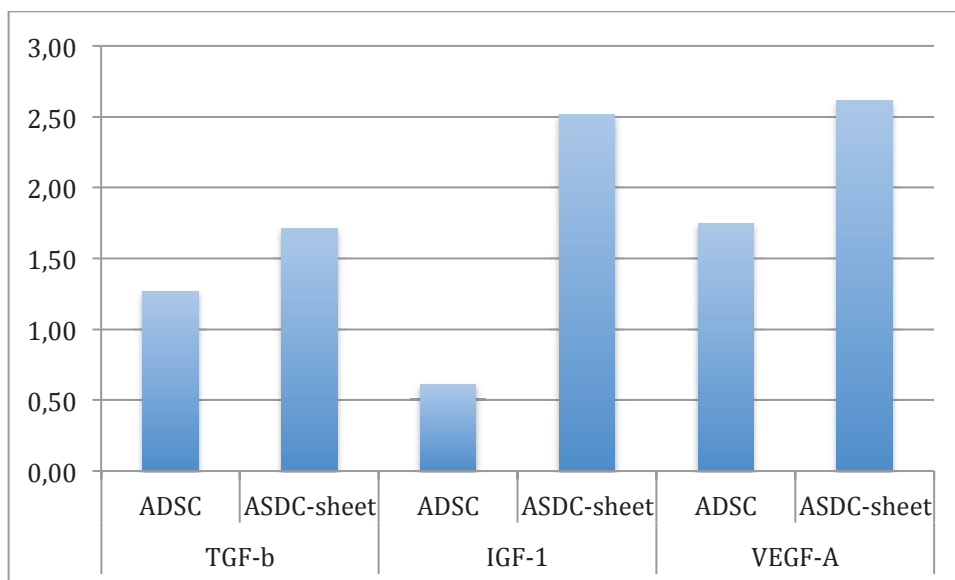


*Figure 17 :* Comparaison de l'expression des gènes de la MEC entre une culture des ADSC sur boîte thermosensible par rapport aux ADSC en suspension.

### 3. Vérification de l'expression des gènes de la matrice extracellulaire et de certains facteurs de croissance:

Afin de valider les résultats précédents, ces expériences ont été complétées par des PCR quantitatives à l'aide d'amorces des principaux gènes intervenant dans la formation de la matrice extracellulaire, et des gènes de facteurs de croissance, notamment angiogéniques.

Les résultats ont confirmé ceux de la « RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array » concernant la détection des gènes de la matrice extracellulaire. D'autres gènes (TGF- $\beta$ , IGF-1, VEGF-A) se sont également révélés surexprimés dans les feuilles de cellules par rapport aux ADSC en suspension (Figure 18).



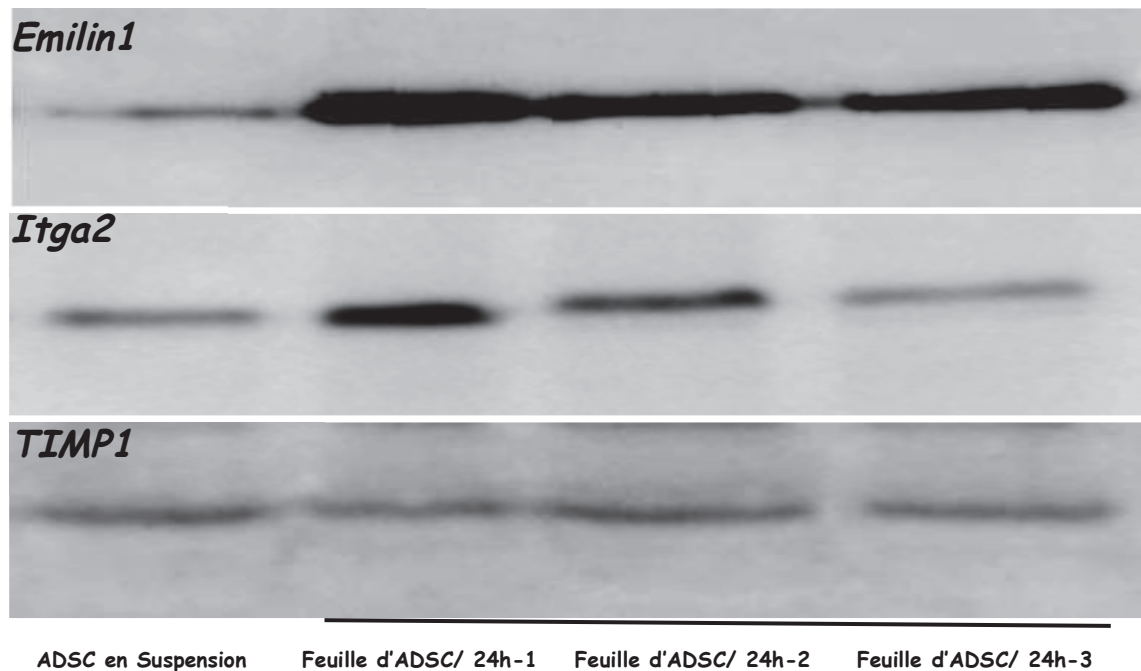
*Figure 18 :* Quantification de l'expression des gènes de certains facteurs de croissance à partir de cellules d'ADSC cultivées sur support thermosensible pendant 24h par rapport à ceux exprimés à partir de cellules en suspension.

#### 4. Expression des protéines de la matrice extracellulaire:

L'analyse de l'expression des gènes de la MEC nous a orientés vers les gènes les plus impliqués dans la formation de la feuille de cellules. Ces résultats ont ensuite été validés au niveau protéique (Tableau 13 et Figure 19).

Protéines	Feuille d'ADSC / ADSC en suspension
<b>Emilin1</b>	3,03 $\pm$ 0,55
<b>Itga2</b>	2,01 $\pm$ 0,71
<b>TIMP1</b>	1,1 $\pm$ 0,23

*Tableau 13 :* Comparaison de l'expression des protéines impliquées dans la formation de la MEC entre les feuilles d'ADSC et les ADSC en suspension.



*Figure 19* : Révélation des bandes correspondantes aux protéines intervenant dans la formation de la MEC.

## B. Evaluation des greffes *in vivo* :

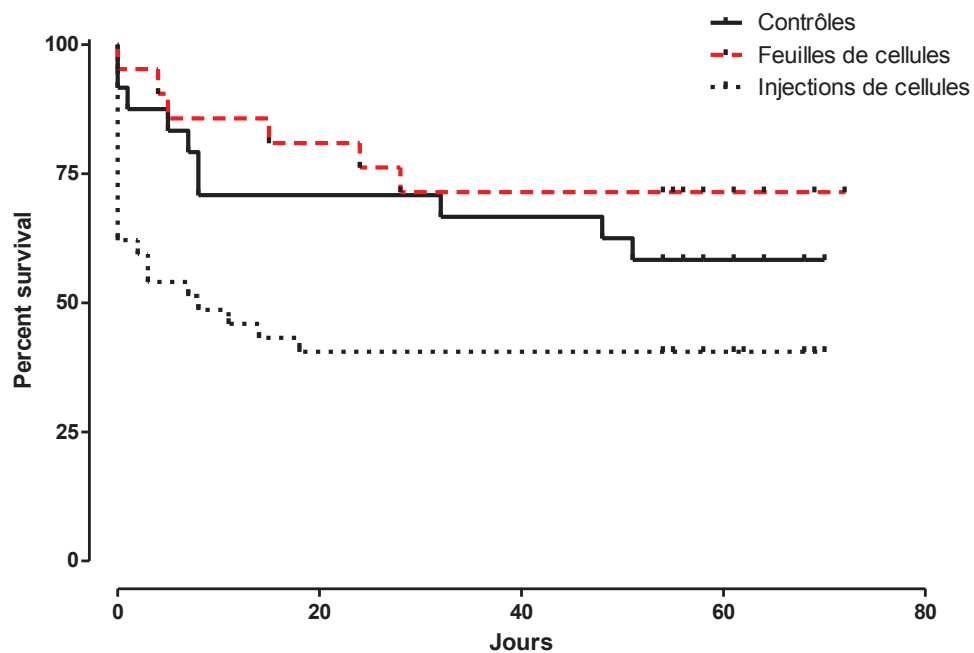
### 1. Survie des animaux :

Le premier critère d'évaluation de l'efficacité du dépôt épicaudique des ADSC via les feuilles de cellules par rapport aux injections directes des mêmes cellules dans le myocarde est le suivi de la survie des animaux au sein de chaque groupe. Dans cette étude, seuls 44 animaux sur 82 rats greffés ont survécu jusqu'au moment du sacrifice.

L'étude de la survie montre qu'il y a une différence significative entre les trois groupes avec une meilleure probabilité de survie observée dans le groupe Feuilles d'ADSC ( $p=0.02$ ). Il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes Contrôle et Injections d'ADSC ( $p=0.09$ ), alors que la probabilité de survie dans le groupe Feuilles de cellules est meilleure que dans le groupe des injections ( $p=0.01$ ) (Figure 20). Il est à noter que la réduction du volume injecté (150  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, ou 80  $\mu$ l) ne modifie pas l'évolution de la courbe de survie (Figure 21). Le risque de mortalité corrélé au volume

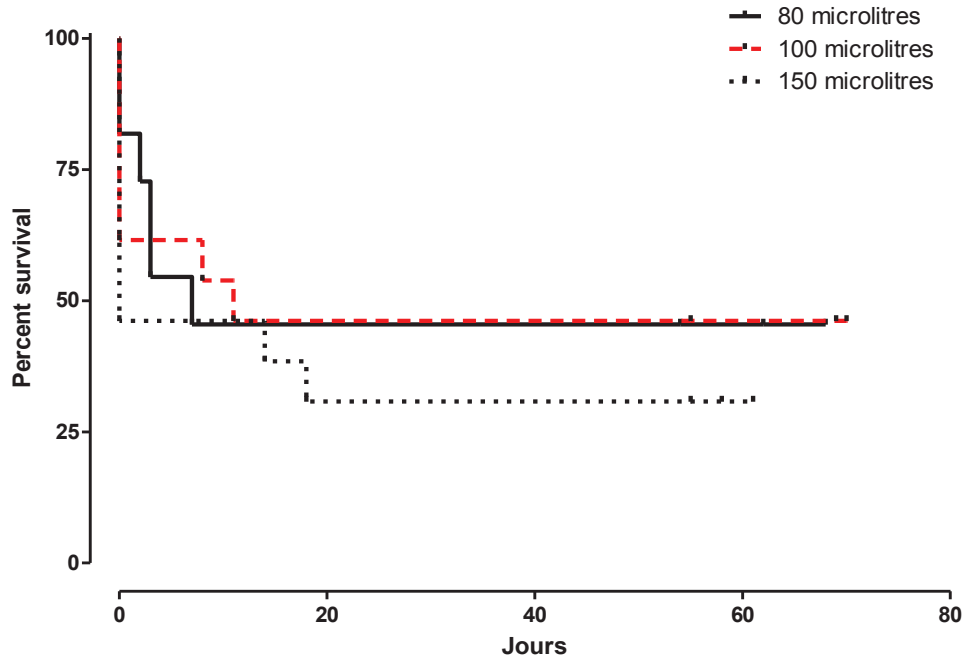
de l'injectât n'est pas significativement différent entre le groupe Contrôle et le groupe Injections de cellules.

Au total , 14/24 rats ont survécu jusqu'à la fin de l'étude (deux mois) dans le groupe Contrôle, 15/37 rats dans le groupe des injections d'ADSC et 15/21 rats vivants dans le groupe Feuilles de cellules. La majorité des morts a été enregistrée pendant les trois premières semaines qui suivent les greffes et particulièrement pendant les premières 48h.



*Figure 20 :* Courbe de survie des animaux en fonction du type de greffe.





*Figure 21* : Courbe de survie des animaux en fonction du volume d'injectat .

## 2. Evaluation de la fonction cardiaque :

Les paramètres de base de l'évaluation de la fonction cardiaque obtenus par échocardiographie deux mois après les transplantations ne sont pas significativement différents entre les différents groupes (Tableau 14). Toutefois, une augmentation des volumes diastoliques et systoliques dans les groupes Injections d'ADSC [Moyenne=25,9%; Intervalle de Confiance (IC) 95%: -0,4%; 59,2% (p=0,05)] et Contrôle [51,2% (IC 95%: 18,6%; 92,8%) (p=0,001)] est observée alors que dans le groupe Feuilles de cellules, ces volumes restent inchangés [2,8%; (IC) 95%: -18,7%; +30%; p=0,81] par rapport à la valeur initiale. Dans les groupes Injections ou Feuilles d'ADSC, les valeurs post-greffes sont identiques et montrent une préservation du remodelage ventriculaire par rapport au groupe contrôle.

Les valeurs de la fraction d'éjection ont confirmé la préservation de la fonction cardiaque dans le groupe Feuilles d'ADSC avec une moyenne de +1,63% (IC 95%: -5,0%; +8,3%) et le groupe Injections de cellules, -3,3% (IC 95%: -9,9%; +3,3%) par rapport au groupe Contrôle [-20,5% (95% CI: -27,4%; -13,6%)].

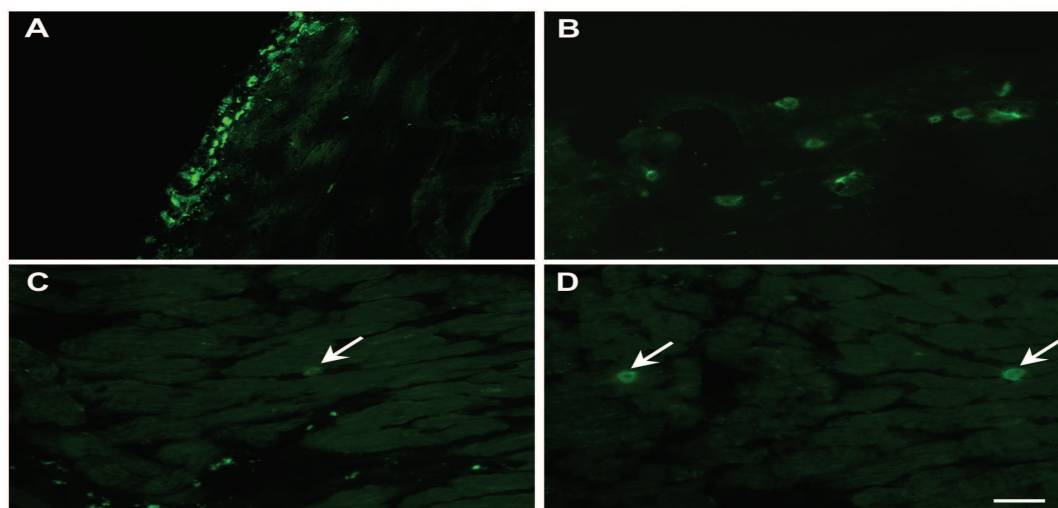
Groupe	N	LVEDV (ml)		LVESV (ml)		LVEF (%)	
		Pré-greffe	Post-greffe	Pré-greffe	Post-greffe	Pré-greffe	Post-greffe
Contrôle	14	0,33±0,09	0,52±0,22*	0,16±0,05	0,37±0,21**	53,0±6,1	32,5±13,3**
Injectons d'ADSC	15	0,33±0,09	0,41±0,10 †	0,18±0,07	0,24±0,08 †	45,6±9,4	42,3±9,2
Feuilles d'ADSC	15	0,39±0,12	0,40±0,13	0,22±0,10	0,22±0,09	43,9±7,6	45,5±9,2

*Tableau 14 :* Comparaison de l'évaluation de l'échocardiographie avant et après greffes au sein des différents groupes (\*p =0,001 vs pré-greffes, \*\*p < 0,0001 et †p =0,05 vs pré-greffes)

### 3. Evaluation immuno-histochimique:

#### 3.1. Détection des cellules greffées :

La présence des cellules greffées a été vérifiée par immunomarquages en utilisant un anticorps reconnaissant les cellules mésenchymateuses (CD90) et un anticorps dirigé contre la GFP (Figure 22).



*Figure 22 :* Détection des cellules greffées grâce à l'anticorps anti-CD90 (A : les cellules de la feuille collées sur le myocarde) et à l'anticorps anti-GFP ((B : les cellules GFP+ dans la feuille, avant implantation), et (C et D : cellules GFP+ dans le myocarde 2 mois après la greffe))

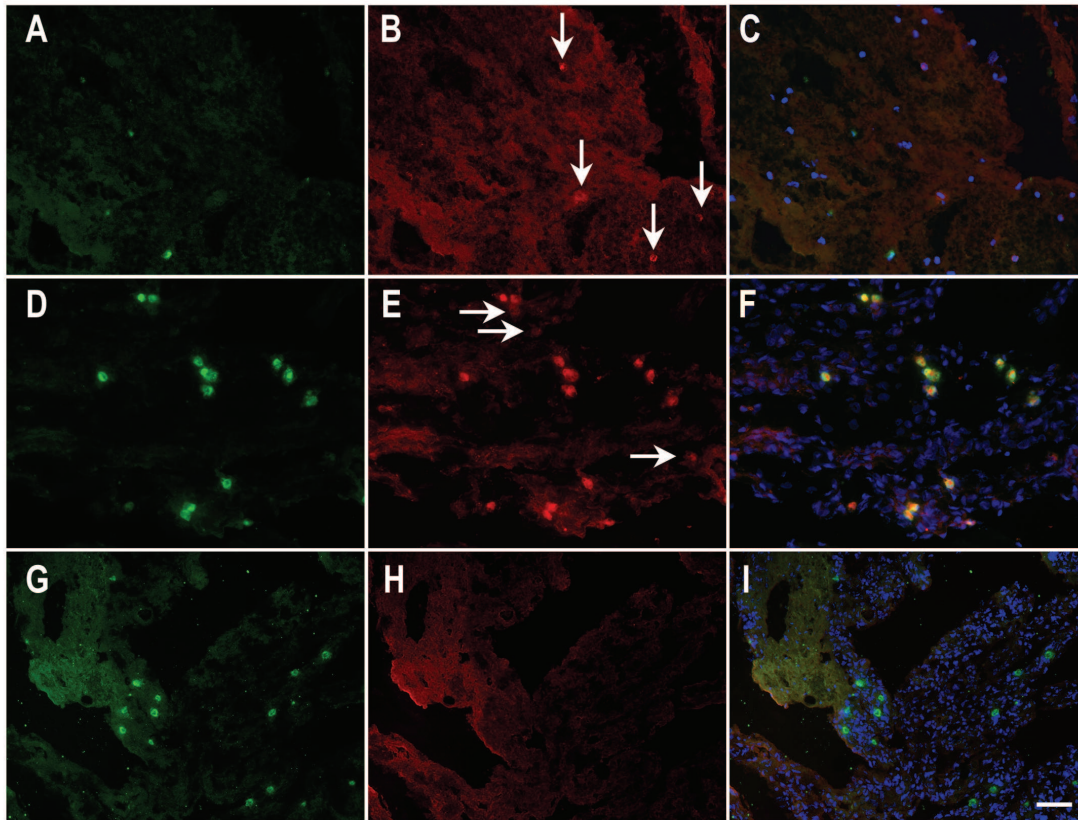
Les cellules greffées marquées à la GFP, sont détectées dans 6 cœurs sur les 6 ayant reçu les feuilles d'ADSC et dans 2 cœurs sur les 4 qui ont reçu les cellules ADSC injectées (Tableau 15). Certaines cellules GFP positives ont été retrouvées à l'intérieur des myocardes et plus précisément autour des vaisseaux.

Groupe	n° Rat	Présence de la GFP			
		à la périphérie du cœur		Dans le myocarde	
		GFP	Bilan GFP	GFP	Bilan GFP
Groupe Feuilles d'ADSC	1	(+++)	6 rats positifs/6 rats	(+++)	6 rats positifs/6 rats
	2	(++)		(+)	
	3	(+++)		(+++)	
	4	(++)		(++)	
	5	(+)		(+)	
	6	(+)		(+)	
Groupe Injections d'ADSC	1	(-)	2 rats positifs/4 rats	(-)	1 rat positif/4 rats
	2	(-)		(-)	
	3	(+)		(-)	
	4	(+)		(+)	

Tableau 15 : Quantification des cellules GFP positives dans les animaux qui ont reçu ces cellules (GFP+).

### 3.2. Phénotypes des cellules greffées :

A la suite de la détection des cellules greffées grâce à l'anticorps anti-GFP, différents doubles marquages ont été utilisés pour définir le devenir des cellules 2 mois après la transplantation : i) Le double marquage anti-GFP/anti-CD68 a montré la non colocalisation des macrophages avec les cellules GFP+ ce qui prouve que les cellules greffées ne sont pas phagocytées par des macrophages (Figure 23 A-C) ; ii) Le double marquage anti-GFP/anti-aActinine est négatif pour toutes les cellules GFP+ ce qui témoigne de la non différenciation des cellules greffées en cellules cardiaques (Figure 23 D-F) ; iii) Le double marquage anti-GFP/anti-RECA montre que certaines cellules sont positives pour les deux anticorps, ce qui témoigne de la différenciation endothéliale de certaines cellules greffées (Figure 23 G-I).



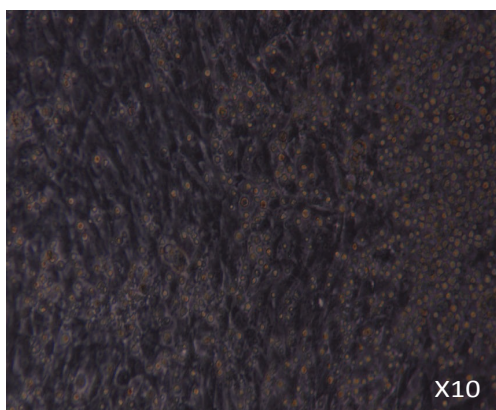
*Figure 23* : Caractérisation des cellules greffées 2 mois après la transplantation grâce à des doubles marquages : anti-GFP/anti-CD68 (A-C), anti-GFP/anti-αActinine (D-F) et anti-GFP/anti-RECA (G-I).  
(ADG : GFP ; BEH : CD68, alpha-actinine et RECA, respectivement ; CFI : images superposées)

### **III. Evaluation d'un patch composite dans un modèle murin d'infarctus du myocarde : Article en cours de rédaction :**

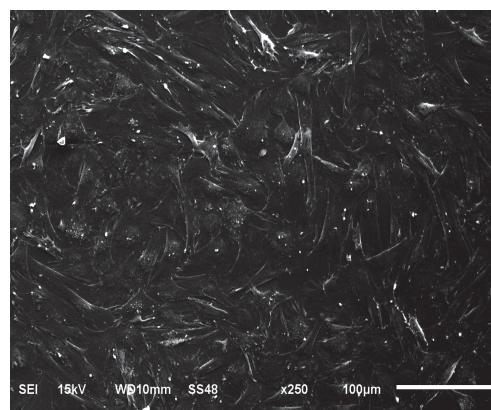
Comme il a été démontré précédemment, l'utilisation de feuilles de cellules d'ADSC déposées sur des régions lésées du myocarde favorise la survie cellulaire, préserve la fonction contractile et réduit de manière significative le risque de mortalité chez les rats. Toutefois, la fragilité de ces feuilles en rend la manipulation délicate, ce qui est une limite dans la perspective d'applications cliniques. Notre première étude ayant montré une équivalence de résultats entre ces feuilles et une éponge de collagène, nous sommes orientés vers ce type de biomatériau qui présente de meilleures propriétés mécaniques. Toutefois, nous avons substitué à l'éponge de collagène initialement testée (GELFOAM®), un film mince (75 microns) du même matériau (GELFILM™) afin d'éviter l'apoptose des cellules ayant migrées au cœur de l'éponge, c'est-à-dire dans la zone la moins perméable au milieu de culture et aux nutriments qu'il contient. Pour optimiser le bénéfice de ces greffes, nous avons par ailleurs opté pour l'ensemencement de ce patch avec une culture mixte associant des cellules à potentiel de différenciation cardiomyogénique (progéniteurs cardiaques dérivés de cellules souches embryonnaires humaines ; CSEh) et des cellules autologues douées de propriétés trophiques (cellules stromales adipeuses (ADSC) déjà testées dans le travail précédent)».

#### **A. Caractérisation du patch composite *in vitro*:**

La colonisation des cultures cellulaires mixtes sur le patch GELFILM™ a été observée *in vitro* par microscopie optique ou microscopie électronique à balayage et a permis de vérifier la répartition et l'organisation des deux populations cellulaires (ADSC et progéniteurs cardiaques) sur la totalité du patch (Figure 24). Cependant il était impossible de déterminer le nombre dans chaque type cellulaire ayant colonisé le patch.



**Observation au microscope optique**



**Observation au microscope électronique à balayage**

*Figure 24:* Observation microscopique des co-cultures ADSC et CSEh au sein du patch GELFILM.

## 1. Etude quantitative des cellulesensemencées sur le patch :

### 1.1. Comptage des cellules au bleu de trypan :

Les résultats des comptages de cellules sont résumés dans le Tableau 16.

Période	Nombre de cellules			
	Culture ADSC (N0) = 300 000	Moyenne	Culture ADSC + CSEh (G0) = 300 000 + 300 000	Moyenne
Après 3 jours	N1= 94 000	93 533	-	-
	N2= 86 000		-	
	N3= 100 600		-	
Après 10 jours	N1= 144 600	125 200	G1= 280 000	287 000
	N2= 111 000		G2= 362 000	
	N3= 120 000		G3= 220 000	

*Tableau 16 :* Survie et prolifération des cellules *in vitro*.

La culture simple comme la co-culture montrent une diminution du nombre de cellules après 10 jours de culture, de presque la moitié par rapport au nombre initialensemencé (125 200 cellules à partir de 300 000 d'ADSC et 287 000 à partir de 300 000 ADSC + 300 000 CSEh).



Comme l'observation en microscopie, cette technique n'a pas permis de déterminer le nombre exact de cellules correspondant à chaque population de cellules d'où l'intérêt de la PCR en temps réel qui se base sur l'utilisation d'amorces de gènes spécifiques humains.

## 1.2. Quantification des progéniteurs cardiaques par PCR:

Le nombre de cellules humaines a été déterminé par PCR à partir de deux patches composites (X1 et X2) en rapportant la concentration d'ADN à celle détectée à l'aide d'une courbe d'étalonnage (Tableau 17 et Figure 25). Le nombre de progéniteurs cardiaques humains détectés sur les deux patches composites après 10 jours de culture a diminué par rapport au nombre de cellulesensemencées initialement. Ces résultats sont compatibles avec ceux obtenus lors des comptages par le bleu de trypan.

Nombre de cellules	Concentration (ng/ $\mu$ l)
100 000	3,079
200 000	4,600
400 000	6,259
500 000	6,868
800 000	9,652
X1 = 106 336	3,419
X2 = 195 639	4,491

Tableau 17: Quantification des cellules humaines au sein des deux patches GELFILM™ *in vitro*.

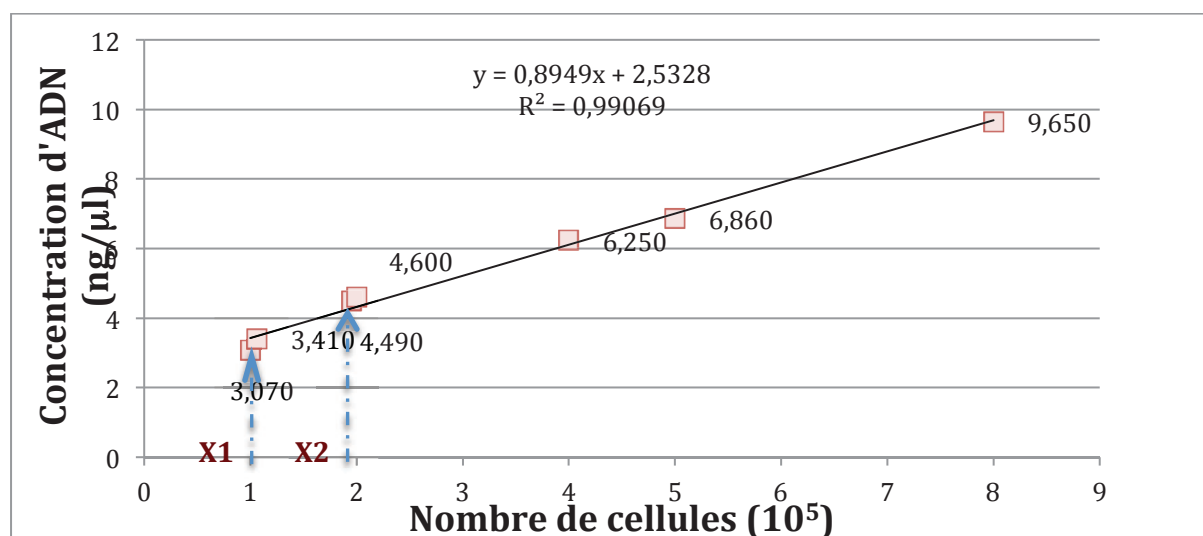
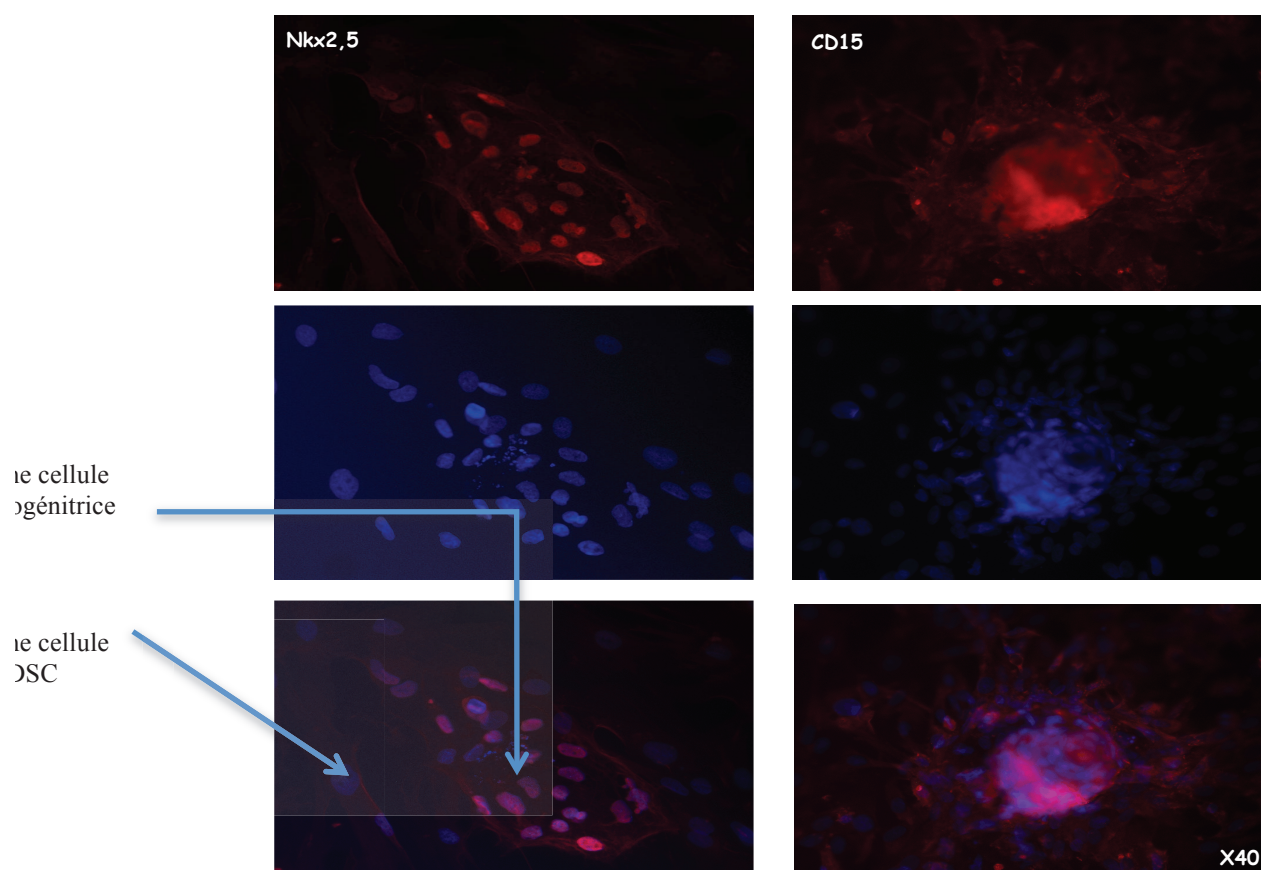


Figure 25: Détermination du nombre des cellules humaines au sein des deux patches GELFILM™ *in vitro* à partir de la courbe d'étalonnage.

## 2. Caractérisation phénotypique des cultures cellulaires mixtes sur le patch GELFILM™ :

La vérification du phénotype des progéniteurs cultivées sur le patch avant les greffes a été réalisée à l'aide des anticorps anti-CD15 et anti-Nkx2.5. Nous avons utilisé le DAPI pour repérer les cellules mésenchymateuses (Figures 26). Les immunomarquages ont montré une organisation des progéniteurs cardiaques sous forme de colonies qui représente une caractéristique de ces cellules. Les superpositions des marqueurs (Nkx2.5 ou CD15) avec la coloration DAPI a permis de distinguer les ADSC (marquées de bleu dans les noyaux) des progéniteurs doublement marqués.



*Figure 26 :* Marquage des différentes populations colonisant le patch composite à fort grossissement



## **B. Evaluation des greffes *in vivo* :**

### **1. Analyse fonctionnelle cardiaque :**

Les deux groupes de rats greffés se sont avérés initialement comparables quant aux fractions (FE et FR) et aux volumes pré-traitements (VTD et VTS). Une amélioration de la fonction contractile basée sur la FE et la FR sur la période de 6 mois a été observée dans le groupe GELFILM™ composite et contraste avec la détérioration de la fonction dans le groupe GELFILM™ seul. Les valeurs de la FE et de la FR sont significatives au 2<sup>ème</sup> mois après la greffe ( $p=0,03$ ) et la tendance ultérieure reste toujours en faveur du groupe composite. En revanche aucune différence significative n'a été constatée sur l'évolution des VTD et VTS durant les 6 mois après les greffes (Tableau 17 et Figures 27-30).

Temps	Groupe	Variable	N	Moyenne	Ecart-type	< IC à 95%	> IC à 95%	Valeur p
Post-IDM	GELFILM™ seul	FE (%)	28	45.33	12.58	40.46	50.21	FE : 0.22 FR : 0.29 VTD : 0.17 VTS : 0.18
		FR (%)	28	24.04	8.23	20.85	27.24	
		VTD (µl)	28	381.64	94.61	344.95	418.32	
		VTS (µl)	28	216.93	87.44	183.02	250.84	
1 mois	GELFILM™ composite	FE (%)	27	41.04	13.18	35.82	46.26	
		FR (%)	27	21.61	8.69	18.18	25.05	
		VTD (µl)	27	417.50	94.71	380.03	454.96	
		VTS (µl)	27	249.20	90.45	213.42	284.98	
	GELFILM™ seul	FE (%)	27	41.51	12.79	36.44	46.57	FE : 0.13 FR : 0.12 VTD : 0.95 VTS : 0.33
		FR (%)	27	21.70	7.76	18.63	24.77	
		VTD (µl)	27	423.37	114.40	378.12	468.63	
		VTS (µl)	27	264.60	101.02	224.64	304.57	
	GELFILM™ composite	FE (%)	22	47.40	13.70	41.32	53.47	
		FR (%)	22	25.45	8.97	21.48	29.43	
		VTD (µl)	22	425.31	121.63	371.38	479.24	
		VTS (µl)	22	235.38	104.62	189.00	281.77	
2 mois	GELFILM™ seul	FE (%)	20	41.25	13.79	34.79	47.70	FE : 0.037 FR : 0.033 VTD : 0.68 VTS : 0.55
		FR (%)	20	21.34	7.85	17.67	25.01	
		VTD (µl)	20	401.63	133.23	339.28	463.98	
		VTS (µl)	20	246.07	120.64	189.61	302.53	
	GELFILM™ composite	FE (%)	15	50.63	10.81	44.65	56.62	
		FR (%)	15	27.15	7.44	23.03	31.27	
		VTD (µl)	15	419.48	117.03	354.67	484.28	
		VTS (µl)	15	224.75	75.28	183.06	266.44	
3 mois	GELFILM™ seul	FE (%)	9	46.91	14.17	36.01	57.80	FE : 0.27 FR : 0.31 VTD : 0.49 VTS : 0.34
		FR (%)	9	25.08	9.07	18.11	32.05	
		VTD (µl)	9	388.67	90.77	318.90	458.44	
		VTS (µl)	9	215.03	97.49	140.09	289.98	
	GELFILM™ composite	FE (%)	7	53.97	9.18	45.48	62.46	
		FR (%)	7	29.26	5.82	23.88	34.64	
		VTD (µl)	7	356.64	88.56	274.74	438.54	
		VTS (µl)	7	169.59	81.41	94.31	244.88	
4 mois	GELFILM™ seul	FE (%)	9	44.59	12.85	34.71	54.47	FE : 0.17 FR : 0.18 VTD : 0.84 VTS : 0.77
		FR (%)	9	23.48	8.11	17.25	29.72	
		VTD (µl)	9	378.33	122.01	284.55	472.11	
		VTS (µl)	9	217.90	99.84	141.16	294.65	
	GELFILM™ composite	FE (%)	6	53.65	10.41	42.73	64.57	
		FR (%)	6	29.18	6.93	21.91	36.45	
		VTD (µl)	6	390.79	111.92	273.34	508.24	
		VTS (µl)	6	203.28	76.47	123.03	283.53	
	5 mois GELFILM™ seul	FE (%)	8	42.85	11.40	33.32	52.38	Pas assez d'effectif
		FR (%)	8	22.33	7.05	16.43	28.22	
		VTD (µl)	8	402.74	147.49	279.43	526.04	
		VTS (µl)	8	238.46	111.74	145.04	331.88	
	GELFILM™ composite	FE (%)	3	55.07	4.46	43.98	66.15	
		FR (%)	3	30.31	2.78	23.41	37.21	
		VTD (µl)	3	419.43	35.16	332.09	506.78	
		VTS (µl)	3	189.09	32.02	109.54	268.63	
6 mois	GELFILM™ seul	FE (%)	7	46.24	15.63	31.78	60.69	Pas assez d'effectif
		FR (%)	7	25.53	9.60	16.65	34.40	
		VTD (µl)	7	364.71	112.86	260.33	469.10	
		VTS (µl)	7	198.93	96.15	110.00	287.86	
	GELFILM™ composite	FE (%)	3	56.47	5.06	43.89	69.05	
		FR (%)	3	30.89	3.48	22.25	39.53	
		VTD (µl)	3	378.00	36.80	286.59	469.41	
		VTS (µl)	3	165.37	33.09	83.16	247.57	

**Tableau 18 :** Evaluation de l'évolution de la fonction cardiaque pendant 6 mois à partir de la veille des greffes.

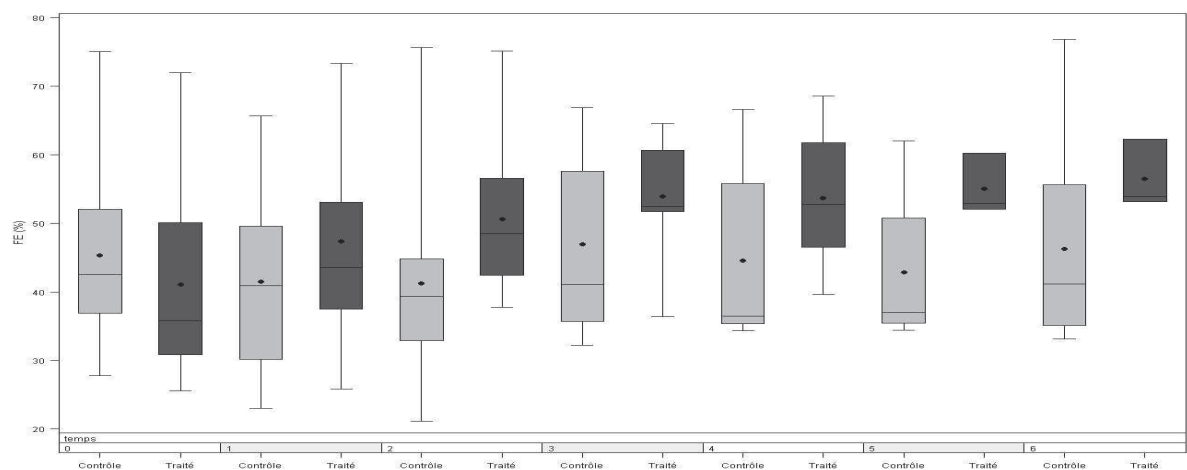


Figure 27 : Représentation graphique de l'évolution de la fraction d'éjection dans les différents groupes

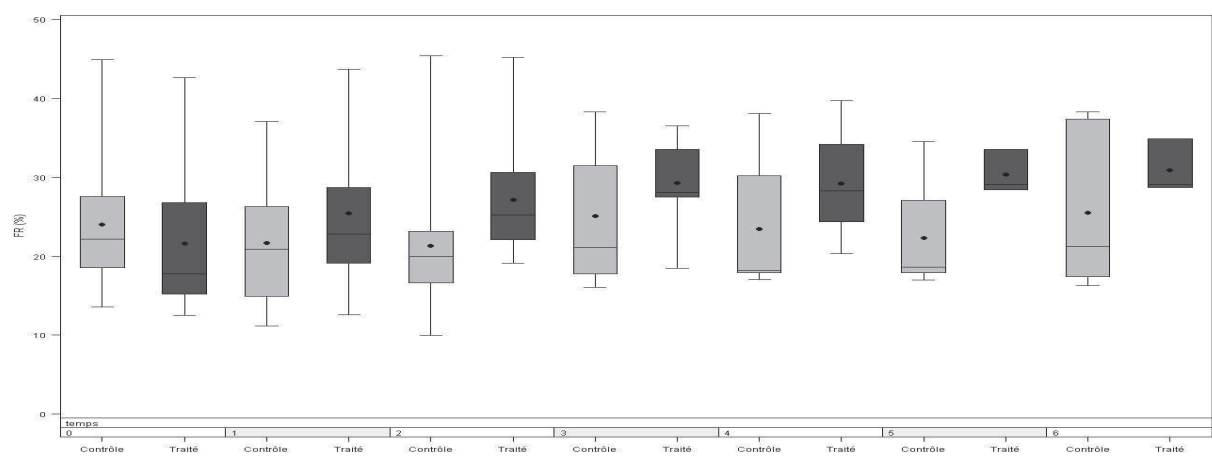


Figure 28 : Représentation graphique de l'évolution de la fraction de raccourcissement dans les différents groupes

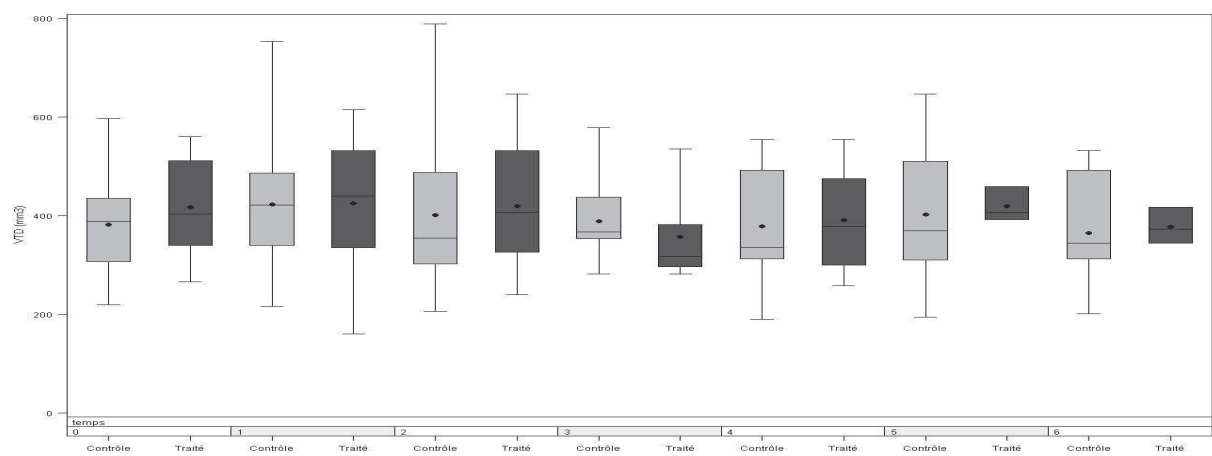
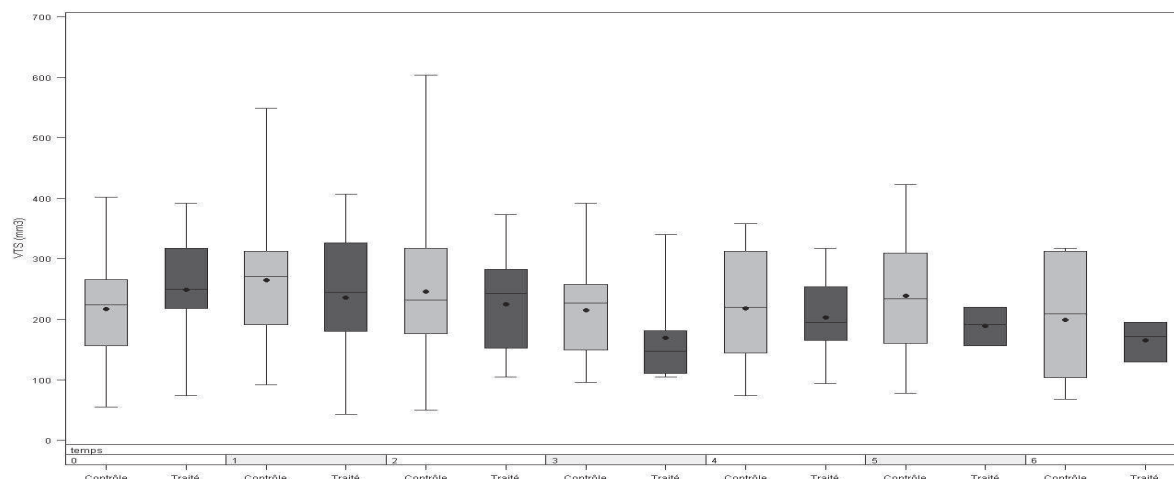


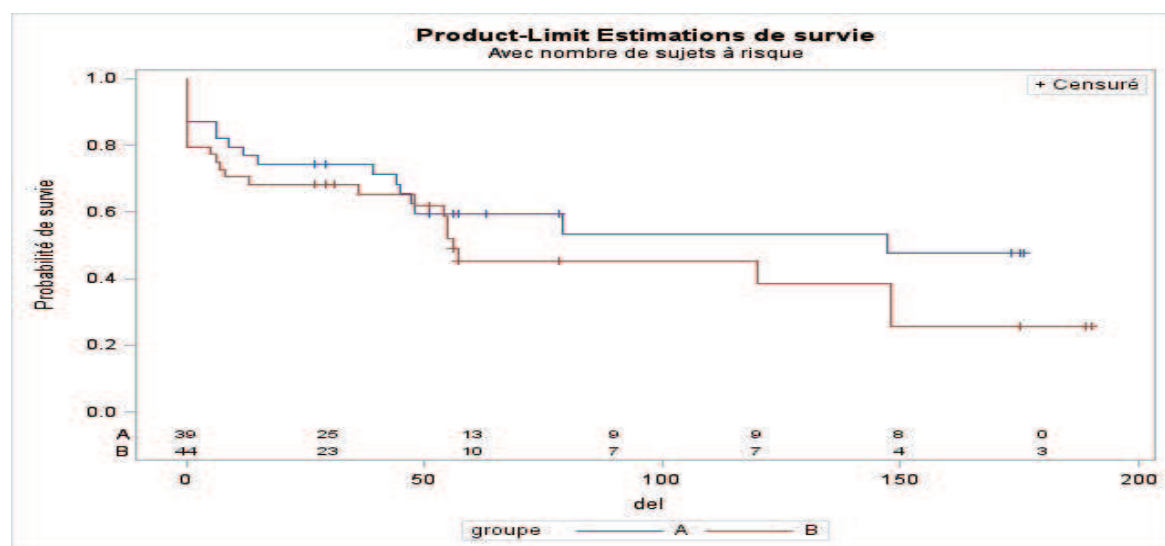
Figure 29 : Représentation graphique de l'évolution des volumes VTD dans les différents groupes



**Figure 30 :** Représentation graphique de l'évolution des volumes VTS dans les différents groupes

## 2. Survie des animaux:

Sur les 83 rats qui ont été greffés pour cette étude, 37 animaux ont été sacrifiés à différents temps ( 12 à un mois, 15 à deux mois et 10 à six mois) (Figure 31). L'étude du risque de mortalité n'a pas montré de différence significative entre les deux groupes ( $p=0,9$  par log-rank test).



**Figure 31 :** Récapitulatif de la probabilité de survie des animaux dans les deux groupes. A : Groupe GELFILM™; B : Groupe GELFILM™ composite. Les chiffres à la base du graphique correspondent aux nombres de rats survivants à chaque mois d'intervalle pendant 6 mois.

### **3. Analyse immuno-histologique:**

L'analyse immuno-histologique a été faite sur les cœurs des animaux qui ont des fractions d'éjection pré-greffes inférieures à 50%. Il s'agit de 6 rats qui ont reçu le patch GELFILM™ composite et 4 rats du groupe recevant le patch GELFILM™ seul.

#### **3.1. Vérification de la présence des cellules greffées deux mois après transplantation :**

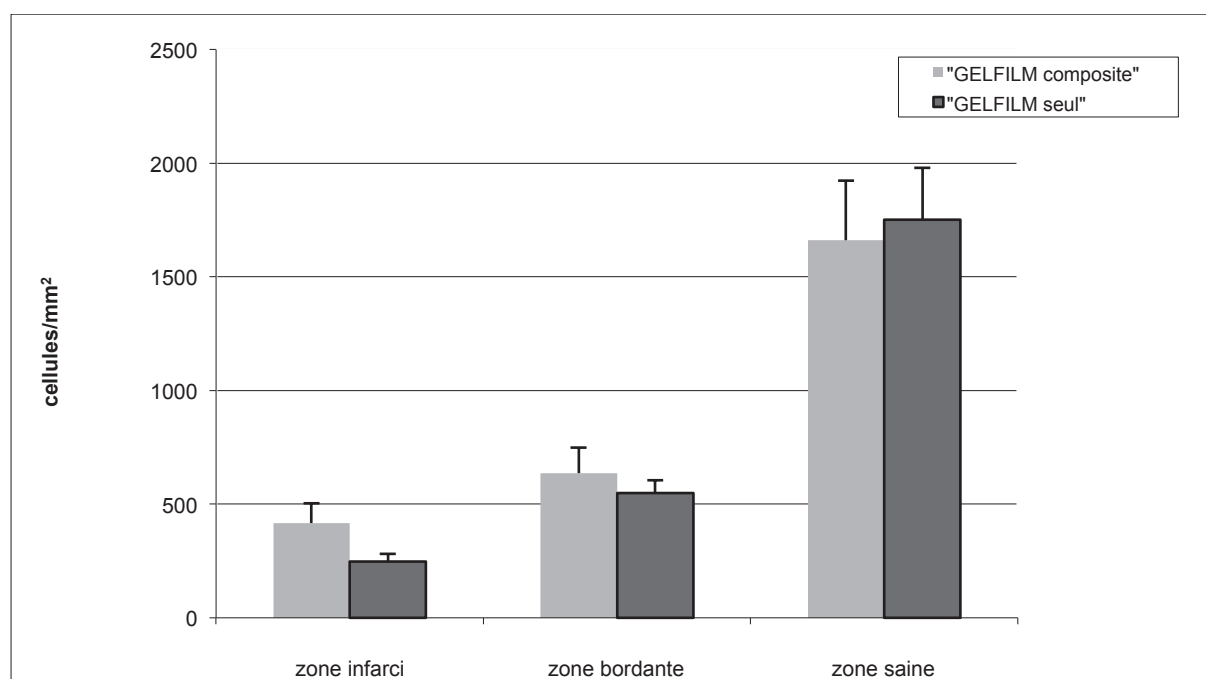
Lors des immunomarquages effectués à l'aide de l'anticorps humain anti-Lamine A/C sur des coupes de cœurs de rats du groupe GELFILM™ composite (6 rats sacrifiés), nous n'avons pas détecté de CSEh. D'autre part nous n'avons pas pu distinguer les cellules ADSC greffées puisqu'elles sont d'origine autologue et n'ont pas été préalablement marquées.

#### **3.2. Evaluation de l'angiogénèse :**

Cent-quatre-vingt coupes de cœurs de rats appartenant à l'un ou l'autre des deux groupes d'animaux greffés ont été marquées avec l'anti-RECA. Une augmentation significative du nombre de vaisseaux sanguins néo-formés a été observée dans la zone infarctée dans les cœurs du groupe de GELFILM™ composite par rapport au groupe GELFILM™ seul ( $p=0,0024$ ). Aucune différence significative du nombre de vaisseaux sanguins n'a été observée dans les zones saine ( $p=0,5$ ) ou bordante ( $p=0,1$ ). Ces résultats sont résumés dans le tableau 18 et la Figure 32.

Région	Groupe	Moyenne	Ecart-type	Borne inférieure de l'IC à 95% pour la moy	Borne supérieure de l'IC à 95% pour la moy
<b>Bordante</b>	GELFILM™ seul (n=6)	548,95	160,68	511,192	586,70
	GELFILM™ composite (n=4)	636,72	208,14	576,28	697,16
<b>Infarctie</b>	GELFILM™ seul (n=6)	247,80	108,78	222,24	273,37
	GELFILM™ composite (n=4)	416,97	135,99	377,48	456,46
<b>Saine</b>	GELFILM™ seul (n=6)	1751,40	398,47	1657,76	1845,04
	GELFILM™ composite (n=4)	1660,65	428,40	1536,25	1785,04

*Tableau 19* : Comparaison de l'angiogénèse entre les différents groupes



*Figure 32* : Evaluation de l'angiogénèse dans les différents groupes.

### 3. Evaluation de la zone de fibrose :

Un nombre identique de coupes (180) a été analysé après coloration par le rouge Sirius pour quantification de la fibrose. Il a ainsi été noté que le pourcentage de la zone de fibrose a significativement diminué ( $p=0,0028$ ) dans les coeurs du groupe GELFILM™ composite (Moyenne (IC95%) : 20,63 (18,13 - 23,14)) par rapport aux coeurs du groupe contrôle (28,63 (25,20 - 32,07) (Tableau 19).

Fibrose (%)			
GROUPE	Moyenne (écart-type)	IC 95%	médiane (IQR)
GELFILM™ seul (n=6)	28,63 (10,15)	25,20 - 32,07	27,62 (12,82)
GELFILM™ composite (n=4)	20,63 (5,93)	18,13 - 23,14	21,12 (8,41)

*Tableau 20 :* Tableau récapitulatif des pourcentages de fibrose dans les différents groupes.

## **Discussion**



L'insuffisance cardiaque après un infarctus du myocarde est une pathologie le plus souvent progressive. La diminution de la fonction contractile est dépendante de la quantité de cardiomyocytes détruits. De plus, l'invasion de la zone infarctée par des macrophages, des monocytes et des neutrophiles va initier un processus inflammatoire conduisant à l'expansion de l'infarctus par activation des métallo-protéases matricielles (MMP) détruisant la matrice extracellulaire. Il en résulte un amincissement de la paroi et une dilatation du ventricule gauche (VG).

L'objectif premier de la thérapie cellulaire est non seulement de repeupler la zone de fibrose par des cellules viables et éventuellement à potentiel contractile, mais aussi d'assurer une interaction avec le tissu hôte. Les différentes techniques de greffes de cellules (injection sous épigardique, par cathéter...) ne permettent qu'à une petite fraction de cellules de rester présentes dans le cœur : celles-ci s'échappent des sites d'injection par les points de ponction et/ou dans les veines et dans les vaisseaux lymphatiques qui entraînent la zone cicatricielle vers la circulation générale. De plus, jusqu'à 90% de cellules retenues vont mourir dans les heures et les jours suivants (63,64). L'absence de fixation des cellules entre elles et à la matrice extracellulaire les rend particulièrement vulnérables (128,129). La perte de contact entre les cellules supprime en effet les interactions qui leur permettent de survivre, proliférer et s'orienter dans leur spécification. Les cellules meurent aussi par nécrose consécutive à l'ischémie (130) et par apoptose du fait de leur relative sensibilité aux signaux apoptotiques (stress oxydatif, lésions nucléaires) et à la déficience locale en facteurs de croissance (131). Enfin, la technique classique d'injections multiples nous est apparue peu satisfaisante car comportant plusieurs inconvénients, notamment la mort cellulaire à laquelle s'ajoutent une distribution aléatoire et finalement assez imprécise des cellules, une faible reproductibilité et la création de multiples foyers intra-myocardiques qui peuvent provoquer des blocs de conduction et donc devenir arythmogènes, indépendamment du type cellulaire injecté (132). **C'est pour cette raison que nous avons tenté de substituer aux injections à l'aiguille la couverture épigardique de la zone cible par un biomatériau cellularisé.** Cette nouvelle approche présente plusieurs avantages : i) elle est atraumatique pour le myocarde, rapide et reproductible ; ii) elle évite aux cellules greffées l'agression que représente la dissociation enzymatique requise par la mise en suspension. Cette couverture épigardique favorise ainsi la

cohésion des cellules à travers leur ancrage à une matrice extra-cellulaire sécrétée pendant la phase de culture. Notre choix s'est d'abord porté sur deux types de produits d'ingénierie tissulaire cardiaque : **les feuilles de cellules** et **une matrice de gélatine**ensemencée avec les cellules d'intérêt, en l'occurrence, dans un premier temps, des myoblastes humains.

**Les feuilles de cellules** cultivées sur des polymères de fibrine (115) ou sur des polymères thermosensibles de poly(N-isopropylacrylamide) (133) représentent une approche prometteuse pour la régénération du myocarde. Elles permettent d'obtenir un tapis cellulaire constitué exclusivement de cellules favorisant l'auto-reconstruction de leur propre matrice extracellulaire. Cette matrice reconstitue une niche bi- ou tridimensionnelle (lorsque plusieurs feuilles sont superposées) susceptible de favoriser la survie, la prolifération et la différenciation des cellules. Lors des greffes de feuilles de myoblastes, nous avons observé une préservation de la fonction du ventricule gauche, une amélioration de l'angiogenèse et dans une moindre mesure, une limitation de la fibrose en comparaison avec le groupe des injections intra-myocardiques directes. Ces données sont cohérentes avec celles qui ont été observées lors des greffes de feuilles de myoblastes dans des modèles de cardiomyopathie, d'origine ischémique (134) et non ischémique (121).

Malgré les bénéfices fonctionnels de la couverture épicardique par les feuilles de myoblastes, il n'y avait que très peu de cellules détectées un mois après la transplantation, même si ce nombre reste toujours supérieur à celui retrouvé dans le groupe des injections directes dans le myocarde. La raison de cette perte massive du greffon reste peu claire. La seule étude qui a montré l'efficacité des feuilles de cellules cultivées sur les polymères de fibrine a impliqué des cardiomyocytes de rats nouveau-nés (115). La greffe de ces feuilles de cellules a montré une interconnexion électromécanique entre les cellules de la feuille et le myocarde hôte, et des propriétés contractiles liées à une bonne capacité d'intégration dans le tissu receveur après stimulation ventriculaire, sans risque arythmogène. En l'absence d'études comparatives entre les effets des feuilles cultivées sur les polymères de fibrine et celles cultivées sur les supports thermosensibles, nous ne pouvons pas exclure que ces dernières soient plus efficaces sur la rétention cellulaire. Par ailleurs, les interactions entre les cellules et les biomatériaux ont été montrées spécifiques du type cellulaire (135).

La deuxième modalité de couverture épicaudique repose sur la greffe d'un biomatériau cellulaarisé sur la zone infarctie du myocarde. Le choix du biomatériau s'est porté sur **une matrice de gélatine (collagène dénaturé) porcine, le GELFOAM®** qui présente plusieurs avantages: un support mécanique stable pour la culture cellulaire, une porosité importante pour la formation des capillaires et une matrice biodégradable présentant un minimum d'immunogénicité (136). En effet, le GELFOAM® a permis de protéger des cellules endothéliales contre le rejet à la fois allogénique et xénogénique (136,137) mais cette propriété n'a pas été testée lors de notre première étude où l'utilisation de myoblastes humains a requis dans tous les cas une thérapie immunosuppressive, aussi bien pour la culture des feuilles de myoblastes que pour les injections directes dans le myocarde. Des études antérieures ont montré que des éponges de collagène incorporant différents types cellulaires peuvent jouer le rôle de transporteurs efficaces pour transférer des cellules souches mésenchymateuses contribuant à la régénération du cartilage osseux (138), des cellules endothéliales pour le contrôle de la réparation vasculaire après une lésion artérielle (136), et des cardiomyoblastes pour préserver la fonction des myocardes ischémiés (86).

Dans notre modèle d'ischémie myocaudique, le dépôt épicaudique des myoblastes incorporés dans le GELFOAM® est à l'origine d'une amélioration de la fonction du ventricule gauche accompagnée d'une néo-angiogénèse dans le patch et la zone infarctie ainsi qu'une limitation de la fibrose. Ce résultat est en accord avec les observations que les matrices de collagène stimulent l'angiogénèse, qu'elles soient utilisées sous forme liquide avec des cellules souches (139) ou sous la forme d'une structure tridimensionnelle solide sans apport cellulaire (85).

Bien que les quantifications de myoblastes au sein de chaque groupe aient montré une meilleure rétention cellulaire dans le groupe GELFOAM®, les cellules retrouvées sont restées collées à la matrice de collagène et n'ont pas pu migrer dans le myocarde. Ceci peut être dû au type cellulaire choisi pour cette étude. En effet, les myoblastes présentent un caractère peu migratoire et sont de plus incapables de se transdifférencier en cardiomyocytes, et d'établir ainsi des connexions électromécaniques avec les cellules hôtes cardiaques (140).

Dans la plupart des études expérimentales publiées à ce jour, la transplantation de myoblastes améliore la fonction cardiaque (141) par des effets paracrines impliquant la stimulation de l'angiogenèse et de la survie des cardiomyocytes, la modulation de la réponse inflammatoire et la recolonisation de la zone cicatricielle (142). Des cellules souches mésenchymateuses humaines incorporées dans une matrice de collagène greffée sur le coeur de rat (81) ou de porc (143), ainsi que des greffes de progéniteurs endothéliaux humains chez la souris nude (144) ont confirmé ces mécanismes paracrines. Toutefois nos expériences *in vivo* n'ont pas permis de retrouver une expression accrue de certains des facteurs les plus souvent impliqués (HGF, VEGF), ce qu'explique peut-être le délai relativement tardif de nos évaluations (1 mois) en regard de l'expression plus précoce de ces médiateurs (134,144).

**En conclusion**, cette première étude a confirmé que l'injection de cellules isolées ne reproduit pas un état physiologique. C'est pourquoi la tendance actuelle en thérapie cellulaire évolue en faveur de l'ingénierie tissulaire qui vise à compléter l'apport des cellules par celui des éléments matriciels et vasculaires nécessaires à leur survie (97).

Le patch de GELFOAM®, bien que constituée par un réseaux fibreux colonisable par les cellules a pour inconvénient majeur d'empêcher la migration des cellules greffées qui restent collées à la matrice. Au contraire, la technique de culture de feuilles de cellules permet l'obtention d'un produit constitué exclusivement de cellules qui peuvent être en contact direct avec les cellules du coeur receveur. Pour cette raison, nous avons renoncé à la matrice GELFOAM® pour adopter la méthode de culture des cellules sous forme de feuilles et avons choisi les cultures sur polymères thermosensibles plutôt que sur fibrine en raison de leur efficacité démontrée avec plusieurs types cellulaires.

Concernant le choix cellulaire de la seconde étude, le tissu adipeux a été préféré au muscle squelettique parce que son prélèvement est moins invasif. De nombreuses études se sont récemment concentrées sur les cellules mésenchymateuses du tissu adipeux, plus particulièrement sur la fraction stromale vasculaire ou SVF en vue d'applications cliniques dans le traitement de pathologies cardiaques ou vasculaires (145). Ces cellules ont fait la preuve de leurs effets bénéfiques dans des modèles d'infarctus chez le petit (45,140,146) et le gros animal (44). Elles ont des effets

angiogéniques bien documentés (147) et partagent avec leurs homologues d'origine médullaire des propriétés immuno-modulatrices rapportées *in vitro* (inhibition de la prolifération des lymphocytes T) et *in vivo* (148). Comme pour l'étude précédente, les propriétés immuno-modulatrices ne sont pas étudiées puisque certaines cellules greffées sont marquées à la GFP, ce qui exige un traitement immunosuppresseur qui a été appliqué dans tous les groupes.

Le bilan de l'utilisation des myoblastes nous a conduits à évaluer les effets **des cellules souches mésenchymateuses autologues d'origine adipeuse délivrées au cœur ischémique sous forme de feuille d'ADSC**. Comme l'amélioration de la fonction cardiaque obtenue par thérapie cellulaire est proportionnelle au nombre de cellules greffées survivantes, nous avons tenté d'optimiser la survie cellulaire en superposant 3 feuilles d'ADSC sur le cœur au moment des greffes (149).

Cette nouvelle étude nous a permis de confirmer que par comparaison avec les injections intra-myocardiques, les feuilles permettent une meilleure rétention des cellules qui est associée à une amélioration de la préservation fonctionnelle. Même si l'on ne peut totalement exclure le rôle du hasard, il se trouve que le groupe traité par les feuilles a aussi présenté une survie supérieure, paramètre rarement pris en compte dans la plupart des études expérimentales de thérapie cellulaire. Indépendamment d'une prédisposition à l'apoptose liée à la dissociation enzymatique des cellules, l'une des limites importantes des injections intra-myocardiques est l'induction d'une réponse inflammatoire et la création de multiples foyers intra-parenchymateux qui peuvent favoriser les ré-entrées (150). En conséquence, ces injections augmentent la vulnérabilité du myocarde à l'arythmie, contrairement aux injections intra-coronaires (132). Song *et al* ont ainsi évoqué l'impact des injections intra-myocardiques sur le risque de mort subite (31,6%) dans leur modèle d'occlusion-reperfusion d'infarctus du myocarde (151). Notre étude ne s'est pas focalisée sur les effets électro-physiologiques des feuilles de cellules mais un travail récent mené par Sekine *et al* (152) a montré qu'elles étaient nettement moins arhythmogènes que les injections, confirmant en cela le bénéfice de leur caractère peu invasif.

Un autre volet important concernant la survie des animaux est la relation entre le risque de mortalité et le volume injecté. Nos résultats n'ont pas montré de différence significative en fonction des volumes injectés, contrairement aux données apportées par Baldazzi et al (153). Cet effet volume a été étudié isolément puisque nous avons choisi de greffer le même nombre de cellules (10 millions), qu'elles soient contenues dans une triple feuille (composée par la superposition de trois feuilles d'ADSC) ou dans un injectat trans-épicaire. La superposition de plusieurs feuilles (152,154) est une composante importante de l'efficacité de la technique : elle permet en effet le transfert d'un plus grand nombre de cellules et le passage d'une surface bi-dimensionnelle (une seule feuille) à un environnement tri-dimensionnel, plus proche de la « niche » physiologique et donc mieux susceptible de favoriser la survie et la croissance des cellules. Il est néanmoins important d'éviter l'empilement d'un trop grand nombre de feuilles car l'épaisseur du biomatériau peut alors conduire à l'anoxie des cellules les plus « superficielles », c'est-à-dire se trouvant au-delà de la limite de diffusion de l'oxygène et des nutriments (155), sauf à intercaler des feuillesensemencées par des cellules à potentiel angiogénique (154) et donc capables de créer un réseau vasculaire à l'intérieur même du bloc de feuilles.

En plus d'un taux de survie plus élevé, nous avons constaté une amélioration de la fonction cardiaque associée à une meilleure rétention cellulaire (évaluée par semi-quantification des cellules greffées) dans le groupe feuilles d'ADSC par rapport au groupe des injections de cellules. Des résultats similaires ont été retrouvés dans un modèle de cardiomyopathie dilatée chez le hamster (121) et un modèle d'infarctus chronique du myocarde chez le rat (134). Cette meilleure rétention observée dans le groupe des feuilles de cellules est probablement due aux différentes interconnexions entre les cellules. Cette cohésion est assurée par la matrice extra-cellulaire sécrétée pendant la phase de culture (154) et dont témoigne, notamment, l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans la formation de cette matrice (Emilin1, Integrine- $\alpha$ 2 et Timp1), expression plus importante dans le groupe feuilles d'ADSC que dans le cas des cellules d'ADSC en suspension (tant aux niveaux génique que protéique). Alors que les protéines Emilin1 et Integrine- $\alpha$ 2 sont impliquées dans l'interaction intercellulaire et l'interaction avec la matrice extracellulaire (156–159), la protéine Timp1 intervient dans l'intégrité de la matrice extracellulaire et dans le contrôle du

remodelage vasculaire (160,161). Cette dernière joue également un rôle anti-apoptotique. Une autre protéine, l'Akt phosphorylée, connue pour être impliquée dans les voies de signalisation de la survie cellulaire (162) est également surexprimée (x 2,5) dans les feuilles d'ADSC par rapport aux cellules en suspension. Les facteurs sécrétés dépendent naturellement du type de cellules ensemencées ; ainsi, la greffe de feuilles constituées par des progéniteurs cardiaques Sca-1<sup>+</sup> améliore la fonction cardiaque, dans un modèle d'infarctus chez la souris, notamment par le biais d'une production de la forme soluble de la (Vascular Cell Endothelial Adhesion molecule)-1 (VCAM-1) qui intervient dans la migration intra-myocardique des cellules et la prévention de leur mort par stress oxydatif en activant diverses voies de signalisation (Akt, p38-MAPK, ERK) (163).

Parallèlement à cette amélioration de la survie cellulaire, les greffes de feuilles d'ADSC ont préservé la fonction contractile, ce qui se traduit par des fractions d'éjection significativement augmentées par rapport au groupe des injections. Cette amélioration de la fonction myocardique semble fortement impliquer une diminution du remodelage ventriculaire et des effets paracrines liés à la transplantation des cellules d'ADSC. En effet, les ADSC ne se transforment pas en cardiomyocytes et le bénéfice observé ne peut donc être attribué à la génération d'un néo-myocarde. Ces résultats sont cohérents avec le rôle réparateur des CSM documenté dans des situations variées qui vont de la réparation des pertes cartilagineuses et osseuses au traitement des maladies cardiovasculaires (164).

Nos résultats *in vivo* ont aussi montré que certaines cellules ADSC implantées ont acquis un phénotype endothélial. Ceci est cohérent avec de nombreuses études ayant apporté la preuve que le tissu adipeux contient une population de cellules souches adultes mésenchymateuses et de précurseurs endothéliaux pouvant se différencier en plusieurs lignages comme les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales (165,166). L'administration de ces cellules semble faciliter la néovascularisation et contribue ainsi à l'amélioration de la fonction ventriculaire (145).

**En conclusion**, cette seconde étude a validé, dans des conditions expérimentales différentes, la supériorité du dépôt épикаrdique de feuilles de cellules sur les injections



intra-myocardiques en termes de survie, rétention cellulaire et amélioration de la fonction ventriculaire gauche.

Cependant, malgré les avantages précédemment décrits des feuilles de cellules, nous avons été confrontés à un problème technique qui nous a conduits, tout en conservant le concept d'un dépôt sur l'épicaire, à chercher une modalité alternative de transfert. En effet, les feuilles de cellules sont fragiles, peuvent se replier ou se déchirer lors des manipulations et à ce titre se prêtent difficilement à une utilisation clinique aisée. La culture des cellules sur des matrices biodégradables (comme la matrice de collagène) représente donc une alternative intéressante pour régler ce problème.

Par ailleurs, l'utilisation des CSM en médecine régénératrice, reste encore limitée malgré des résultats *in vivo* encourageants. En effet, les capacités de régénération des CSM diminuent avec l'âge du donneur. L'amplification des CSM *in vitro* peut également entraîner à long terme l'apparition de modifications altérant leur phénotype. De plus, les données concernant les propriétés immunomodulatrices des CSM après différenciation sont contradictoires et devront être clarifiées avant leur possible utilisation clinique (167).

L'utilisation de cellules souches embryonnaires est une alternative potentielle pour assurer une régénération du myocarde grâce à leur capacité à se différencier en cardiomyocytes pouvant se coupler, sur le plan électromécanique, avec ceux du cœur receveur.

Même si les deux premières études utilisant les myoblastes squelettiques et les cellules mésenchymateuses se sont révélées positives sur le critère principal de jugement (habituellement la fraction d'éjection du ventricule gauche), ces bénéfices restent marginaux et la régénération du myocarde par thérapie cellulaire reste encore à accomplir. Sur la base des données de la littérature et de celles tirées de nos travaux expérimentaux, il apparaît que la condition principale pour assurer cet objectif de régénération est le choix du type cellulaire le plus approprié dans le contexte d'une insuffisance cardiaque sévère.

Il est donc logique de faire l'hypothèse que les cellules les plus efficaces dans ce



cadre soient celles qui ont la capacité de produire des facteurs de croissance potentiellement cytoprotecteurs, de devenir de véritables cardiomyocytes fonctionnellement intégrés (168) et de remplacer ainsi ceux qui ont été détruits. Il nous est apparu que les meilleurs candidats seraient **des progéniteurs cardiaques dérivés de CSE humaines (169), c'est-à-dire des cellules ayant déjà une destinée cardiaque mais encore capables de mitoses conduisant à leur différenciation terminale en cardiomyocytes et donc susceptibles de participer à la régénération du myocarde.** Cette hypothèse est confortée par des données expérimentales convergentes (168,170–184) même si certains investisseurs privilégient la mise en jeu préférentielle de mécanismes paracrines plutôt qu'un remplacement de la masse cellulaire nécrosée par des cardiomyocytes dérivés des cellules greffées (185,186).

Pour tenter de limiter l'ischémie inhérente à l'hypovascularisation des zones dans lesquelles sont transplantées les cellules souches et d'optimiser la survie de ces dernières dans un environnement par définition hostile (cicatrice fibreuse), nous avons opté pour une **co-transplantation de cellules progénitrices cardiaques humaines et de cellules souches mésenchymateuses.** Nous avons construit cette étude en partant de l'hypothèse, que la survie des cellules d'« intérêt », c'est-à-dire celles auxquelles sont prêtés des effets cardio-protecteurs, peut être augmentée si on leur adjoint des cellules « support » douées de propriétés trophiques, et notamment angiogéniques (187–191). L'intérêt des patches co-ensemencés par deux populations cellulaires différentes et potentiellement synergiques a déjà été établi (192–194). A notre connaissance, c'est la première fois qu'a été testée sur un patch, l'association de cellules cardiaques progénitrices dérivées de CSE humaines avec des CSM d'origine adipeuse de rat.

Vue la maniabilité restreinte des feuilles de cellules, nous avons choisi d'utiliser un patch moins épais que le GELFOAM® constitué de gélatine biodégradable (GELFILM™). Ce patch ensemencé avec les deux populations cellulaires présente une surface mécanique stable et offre un meilleur soutien structural au moment des greffes.

Nos résultats concernant l'évaluation de la fonction contractile et montrant des fractions d'éjection et de raccourcissement significativement supérieures dans le groupe recevant le patch composite par rapport au groupe contrôle après 1 et 2 mois de greffe sont cohérents avec ceux déjà publiés par le laboratoire (195). Cette dernière étude repose sur la culture de feuilles composites réalisées à partir d'ADSC autologues et

de progéniteurs cardiaques de primates greffées dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le singe Rhésus. Nos résultats recoupent aussi ceux de travaux précédents montrant qu'une matrice de collagène, avec ou sans cellules, peut être greffée avec succès sur le cœur infarci (85).

Toutefois, par comparaison avec les études antérieures, la nôtre a la particularité d'avoir étudié la fonction du cœur **durant une période de 6 mois**. Même si le faible nombre d'animaux encore disponibles à la fin de la période de suivi incite à des conclusions prudentes, les résultats font assez nettement apparaître que l'amélioration de la fonction observée dans le groupe traité par le patch composite est nette et soutenue dans le temps.

Le bénéfice observé dans le groupe traité par le patch composite est sans doute largement due à une augmentation de l'angiogénèse, constatée après 2 mois et associée à une limitation de la zone de fibrose. Ces observations sont en accord avec celles de Stevens et al (192) qui ont montré l'importance de la co-culture des CSEh avec des cellules à potentialités stromale et angiogénique. Lors de la combinaison de ces deux populations cellulaires, une vascularisation a pu se développer dans le patch avec des connexions entre ces vaisseaux et ceux du cœur (192,196). Cette angiogénèse serait en fait l'un des mécanismes majeurs de l'amélioration fonctionnelle induite par les cardiomyocytes dérivés des CSE mais aussi par les CSM adipeuses (185).

L'un des problèmes posés par ces patchs épocardiques est la capacité des cellules greffées à migrer à l'intérieur du myocarde pour s'y connecter avec (163) les cardiomyocytes hôtes sous-jacents (197), pré-requis à une contribution directe des progéniteurs cardiaques transplantés à l'activité contractile du cœur. Ces données restent subordonnées à une utilisation adéquate des cellules à potentialité contractile. Toutefois, lors de nos expériences *in vivo*, nous n'avons pas réussi à détecter les cellules humaines greffées ni à l'intérieur ni même à la surface du cœur, là où elles avaient été déposées. Il y a au moins trois explications possibles à cette absence de cellules. La première est une interaction délétère entre les deux populations cellulaires ensemencées sur le patch. Dans les conditions habituelles, les progéniteurs cardiaques dérivés des CSE prolifèrent et forment des colonies lorsqu'ils sont cultivés sur des fibroblastes irradiés. Dans notre travail, cependant, ils ont été cultivés sur des ADSC mitotiquement très actifs comme le montre la rapidité avec laquelle ces cellules ont

colonisé le patch. On ne peut donc exclure une compétition entre les deux populations cellulaires pour les facteurs de croissance présents dans le milieu, compétition qui a pu se faire au détriment des progéniteurs et obérer leur survie. Par ailleurs, nos observations microscopiques de patches co-cultivés *in vitro* ont montré une condensation de cellules vers les extrémités des patches laissant à penser que les cellules, une fois ensemencées, ont tendance à glisser vers les bords des puits de culture. La surface des puits (1,9 cm<sup>2</sup>) étant largement supérieure à celle du patch (1 cm<sup>2</sup>), nous avons utilisé des inserts pour pallier à ces fuites de cellules hors du patch. Malgré ces précautions, les résultats de la quantification des cellules *in vitro*, ont montré une diminution du nombre de cellules par rapport au chiffre initial, ce qui pourrait accréditer ce phénomène d'incompatibilité ou de compétition entre les deux populations cellulaires. Toutefois, cette hypothèse est fragilisée par les résultats de nos tests qualitatifs *in vitro* réalisés sur les cultures composites et qui n'ont pas décelé d'apoptose ; de même, aucune toxicité n'a été notée après co-culture d'ADSC humains avec des cardiomyocytes de rat (198). Une seconde possibilité est que la discordance importante de chronotropisme entre les progéniteurs humains (programmés pour battre à 70-80 battements par minute) et les cœurs de rat (300-400 battements par minute) ait entraîné la mort de ces progéniteurs, incapables de soutenir les contraintes physiques imposées par une telle tachycardie. La troisième hypothèse est celle du rejet. Compte-tenu de la longueur du suivi des animaux, nous avons renoncé à des injections quotidiennes de ciclosporine au profit de micro-pompes osmotiques sous-cutanées censées délivrer la drogue de façon contrôlée et continue. En fait, les contrôles aléatoires des taux sériques de ciclosporine ont montré des valeurs extrêmement variables, ce qui jette un doute sérieux sur la fiabilité de ces dispositifs. Si la disparition des progéniteurs xénogéniques est due au rejet, elle confirme que les CSM n'ont pas un effet tolérogène suffisant pour que l'on puisse s'affranchir d'une immunomodulation complémentaire efficace. Cette hypothèse est en accord avec nos travaux précédents (199) montrant que le bénéfice de co-transplanter des CSM avec des CSE est principalement dû aux effets trophiques des premières. Quant aux CSM, leur origine autologue n'a naturellement pas permis, en l'absence de marquage préalable, de les identifier.

**En conclusion,** la combinaison de cellules à potentiel cardiomyogénique et de cellules à potentiel trophique cultivées sur un patch en gélatine a permis une amélioration de la fonction tactile associée à une diminution de taille de la cicatrice fibreuse et une augmentation de la néo-angiogénèse. Ces bénéfices semblent être liés surtout aux effets paracrines des cellules stromales (166) même si l'on ne peut formellement exclure que des facteurs sécrétés par ces cellules, ou par les progéniteurs à un stade très précoce après la greffe (c'est-à-dire avant qu'ils ne disparaissent et échappent à notre première évaluation histologique à 1 mois) aient pu recruter d'hypothétiques cellules souches cardiaques résidentes et contribuer ainsi à une forme de régénération endogène (200,201).

Au total, ces résultats valident l'intérêt du dépôt épiqueur des cellules. Même s'il est difficile d'établir la part respective des deux populations cellulairesensemencées dans le résultat final, il semble logique de poursuivre dans cette direction d'une co-transplantation de cellules à potentiel contractile, au sein desquelles les CSE semblent à ce jour les plus efficaces, et de cellules fournissant un support trophique. Il reste à définir le phénotype optimal de ces cellules nourricières, les densités respectives d'ensemencement les plus efficaces et la nature du biomatériau. Ce dernier point est critique car les processus cellulaires (survie, prolifération, différenciation) ne sont pas seulement sensibles aux signaux biochimiques mais sont également modulés par les propriétés physiques du substrat, et notamment son module d'élasticité (202).

## **Conclusions générales et perspectives**

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité au monde, aussi bien pour les hommes que pour les femmes. Les thérapies actuelles ont une efficacité limitée due, en partie, à l'incapacité intrinsèque du cœur à se régénérer, et en ultime recours, à la pénurie du don d'organes. La possibilité de régénérer le cœur par l'apport de nouvelles cellules représente donc une stratégie intéressante, à l'étude depuis plus d'une dizaine d'années. La transplantation cellulaire soulève encore plusieurs questions telles que le choix du type cellulaire, le mode d'administration des cellules, et l'optimisation de la survie du greffon cellulaire. Les limites des injections intra-myocardiques nous ont d'abord conduits, lors de ce travail de thèse, à substituer aux injections à l'aiguille la couverture épicardique de la zone infarctée par un biomatériau cellularisé. Nous avons développé deux stratégies d'ingénierie tissulaire qui ont fait la preuve de leur efficacité, l'utilisation d'un patch étant finalement préférée à celle de feuilles de cellules (sans matériau étranger), principalement pour des raisons pratiques de résistance physique aux manipulations.

Les différentes sources de cellules, principalement les myoblastes squelettiques et les cellules mésenchymateuses, utilisées initialement ont eu des effets fonctionnels bénéfiques mais n'ont pas atteint l'objectif de régénération myocardique. Ainsi nous avons introduit secondairement dans ce but des progéniteurs cardiaques dérivés de cellules souches embryonnaires humaines co-transplantés sur une matrice biodégradable avec des cellules mésenchymateuses d'origine adipeuse à potentiel trophique. Malgré les bénéfices fonctionnels et angiogéniques de cette combinaison nous avons échoué à détecter les progéniteurs humains greffés, peut-être à cause d'une immunosuppression insuffisante. Parallèlement à la mise au point de nouvelles techniques de prévention du rejet, notamment fondées sur l'induction de tolérance, la culture composite doit donc être améliorée afin d'optimiser la transdifférenciation *in vivo* des cellules greffées en cellules cardiaques capables d'établir des connexions électromécaniques avec celles du receveur et d'acquérir une organisation spatiale satisfaisante à l'anisotropisme. Le succès de cette approche ne dépend sans doute pas seulement du phénotype initial des cellules greffées mais aussi des conditions physiques et biochimiques de leur environnement, *in vitro* puis *in vivo*, d'où l'importance de concevoir aujourd'hui la thérapie cellulaire non plus comme la seule injection de cellules mais plutôt comme l'apport d'un ensemble cellules-matrice-vaisseaux.

Ces nouvelles stratégies d'ingénierie tissulaire pourraient alors être appliquées à d'autres modèles de maladies cardiovasculaires tels que la cardiomyopathie dilatée d'origine non ischémique, pathologie où les thérapeutiques conventionnelles sont encore plus démunies que dans les cardiopathies ischémiques.

## **Bibliographie**



1. Moussa mouhamad. L'insuffisance cardiaque chronique systolique. Comment améliorer la prise en charge par les medecins? Thèse de l'Université Paris Descartes; 2010.
2. Cowie MR. Annotated references in epidemiology. Eur. J. Heart Fail. 1999 mars;1(1):101-7.
3. Hunt SA, Baker DW, Chin MH, Cinquegrani MP, Feldman AM, Francis GS, et al. ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). J. Am. Coll. Cardiol. 2001 déc;38(7):2101-13.
4. Zannad F, Briancon S, Juilliere Y, Mertes PM, Villemot JP, Alla F, et al. Incidence, clinical and etiologic features, and outcomes of advanced chronic heart failure: the EPICAL Study. Epidémiologie de l'Insuffisance Cardiaque Avancée en Lorraine. J. Am. Coll. Cardiol. 1999 mars;33(3):734-42.
5. Cowie MR, Mosterd A, Wood DA, Deckers JW, Poole-Wilson PA, Sutton GC, et al. The epidemiology of heart failure. Eur. Heart J. 1997 févr;18(2):208-25.
6. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJV, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). Eur. Heart J. 2008 oct;29(19):2388-442.
7. McCullough PA, Philbin EF, Spertus JA, Kaatz S, Sandberg KR, Weaver WD. Confirmation of a heart failure epidemic: findings from the Resource Utilization Among Congestive Heart Failure (REACH) study. J. Am. Coll. Cardiol. 2002 janv 2;39(1):60-9.
8. Stewart S, MacIntyre K, MacLeod MM, Bailey AE, Capewell S, McMurray JJ. Trends in hospitalization for heart failure in Scotland, 1990-1996. An epidemic that has reached its peak? Eur. Heart J. 2001 févr;22(3):209-17.
9. Schaufelberger M, Swedberg K, Köster M, Rosén M, Rosengren A. Decreasing one-year mortality and hospitalization rates for heart failure in Sweden; Data from the Swedish Hospital Discharge Registry 1988 to 2000. Eur. Heart J. 2004 févr;25(4):300-7.
10. Deedwania PC. The key to unraveling the mystery of mortality in heart failure: an integrated approach. Circulation. 2003 avr 8;107(13):1719-21.
11. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, et al. 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation.

Circulation. 2009 avr 14;119(14):e391–479.

12. Rich MW. Epidemiology, pathophysiology, and etiology of congestive heart failure in older adults. *J Am Geriatr Soc*. 1997 août;45(8):968–74.

13. Min J-Y, Yang Y, Sullivan MF, Ke Q, Converso KL, Chen Y, et al. Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 2003 févr;125(2):361–9.

14. Min J-Y, Yang Y, Converso KL, Liu L, Huang Q, Morgan JP, et al. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J. Appl. Physiol*. 2002 janv;92(1):288–96.

15. Yang Y, Min J-Y, Rana JS, Ke Q, Cai J, Chen Y, et al. VEGF enhances functional improvement of postinfarcted hearts by transplantation of ESC-differentiated cells. *J. Appl. Physiol*. 2002 sept;93(3):1140–51.

16. Hodgson DM, Behfar A, Zingman LV, Kane GC, Perez-Terzic C, Alekseev AE, et al. Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2004 août;287(2):H471–9.

17. Singla DK, Hacker TA, Ma L, Douglas PS, Sullivan R, Lyons GE, et al. Transplantation of embryonic stem cells into the infarcted mouse heart: formation of multiple cell types. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2006 janv;40(1):195–200.

18. Kofidis T, de Bruin JL, Hoyt G, Lebl DR, Tanaka M, Yamane T, et al. Injectable bioartificial myocardial tissue for large-scale intramural cell transfer and functional recovery of injured heart muscle. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 2004 oct;128(4):571–8.

19. Ménard C, Hagège AA, Agbulut O, Barro M, Morichetti MC, Brasselet C, et al. Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet*. 2005 sept 17;366(9490):1005–12.

20. Hagège AA, Demil N, Errieau G, Aupetit J-F, Dievart F, Mourad J-J. First evaluation using a validated scale of the risk of congestive heart failure among hypertensive patients treated by general practitioners (O-PREDICT survey). *Arch Cardiovasc Dis*. 2010 mars;103(3):176–83.

21. Tabet J-Y, Meurin P, Driss AB, Weber H, Renaud N, Grosdemouge A, et al. Benefits of exercise training in chronic heart failure. *Arch Cardiovasc Dis*. 2009 oct;102(10):721–30.

22. Menasché P. Stem cell therapy for chronic heart failure: lessons from a 15-year experience. *C. R. Biol*. 2011 juill;334(7):489–96.

23. Menasché P. Myoblast-based cell transplantation. *Heart Fail Rev*. 2003 juill;8(3):221–7.

24. Vilquin J-T, Marolleau J-P. [Cell transplantation in heart failure management].

Med Sci (Paris). 2004 juill;20(6-7):651–62.

25. Sim EKW, Jiang S, Ye L, Lim YL, Ooi OC, Haider KH. Skeletal myoblast transplant in heart failure. *J Card Surg*. 2003 août;18(4):319–27.

26. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 nov 6;282(5391):1145–7.

27. Planat-Benard V, Silvestre J-S, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004 févr 10;109(5):656–63.

28. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003 sept 19;114(6):763–76.

29. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 août 25;126(4):663–76.

30. Mouly V, Beauchamp J. [What is a satellite muscle cell?]. *Med Sci (Paris)*. 2003 juill;19(6-7):696.

31. Gavira JJ, Herreros J, Perez A, Garcia-Velloso MJ, Barba J, Martin-Herrero F, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation in patients with nonacute myocardial infarction: 1-year follow-up. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 2006 avr;131(4):799–804.

32. Herreros J, Prósper F, Perez A, Gavira JJ, Garcia-Velloso MJ, Barba J, et al. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur. Heart J*. 2003 nov;24(22):2012–20.

33. Hagège AA, Marolleau J-P, Vilquin J-T, Alhéritière A, Peyrard S, Duboc D, et al. Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation*. 2006 juill 4;114(1 Suppl):I108–13.

34. Pouzet B, Ghostine S, Vilquin JT, Garcin I, Scorsin M, Hagège AA, et al. Is skeletal myoblast transplantation clinically relevant in the era of angiotensin-converting enzyme inhibitors? *Circulation*. 2001 sept 18;104(12 Suppl 1):I223–8.

35. Tambara K, Sakakibara Y, Sakaguchi G, Lu F, Premaratne GU, Lin X, et al. Transplanted skeletal myoblasts can fully replace the infarcted myocardium when they survive in the host in large numbers. *Circulation*. 2003 sept 9;108 Suppl 1:II259–63.

36. Reinecke H, Poppa V, Murry CE. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2002 févr;34(2):241–9.

37. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants

of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966 déc;16(3):381–90.

38. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997 avr 4;276(5309):71–4.

39. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 avr 2;284(5411):143–7.

40. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol*. 2000 août;28(8):875–84.

41. Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin MJ, Dennis J, Haynesworth SE, et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant*. 2004 mars;33(6):597–604.

42. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003 févr 15;75(3):389–97.

43. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res*. 2007 mai 11;100(9):1249–60.

44. Valina C, Pinkernell K, Song Y-H, Bai X, Sadat S, Campeau RJ, et al. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction. *Eur. Heart J*. 2007 nov;28(21):2667–77.

45. Mazo M, Planat-Bénard V, Abizanda G, Pelacho B, Léobon B, Gavira JJ, et al. Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction. *Eur. J. Heart Fail*. 2008 mai;10(5):454–62.

46. Kim Y, Kim H, Cho H, Bae Y, Suh K, Jung J. Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Cell. Physiol. Biochem*. 2007;20(6):867–76.

47. Jorgensen C, Deschaseaux F, Planat-Benard V, Gabison E. [Mesenchymal stem cells: A therapeutic update]. *Med Sci (Paris)*. 2011 mars;27(3):275–84.

48. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004 avr 8;428(6983):664–8.

49. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004 avr 8;428(6983):668–73.

50. Rubart M, Pasumarthi KBS, Nakajima H, Soonpaa MH, Nakajima HO, Field LJ. Physiological coupling of donor and host cardiomyocytes after cellular transplantation. *Circ. Res.* 2003 juin 13;92(11):1217–24.
51. Wei H, Juhasz O, Li J, Tarasova YS, Boheler KR. Embryonic stem cells and cardiomyocyte differentiation: phenotypic and molecular analyses. *J. Cell. Mol. Med.* 2005 déc;9(4):804–17.
52. Kofidis T, de Bruin JL, Yamane T, Tanaka M, Lebl DR, Swijnenburg R-J, et al. Stimulation of paracrine pathways with growth factors enhances embryonic stem cell engraftment and host-specific differentiation in the heart after ischemic myocardial injury. *Circulation.* 2005 mai 17;111(19):2486–93.
53. Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier J-M, Kane GC, Terzic A, et al. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB J.* 2002 oct;16(12):1558–66.
54. Laflamme MA, Gold J, Xu C, Hassanipour M, Rosler E, Police S, et al. Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells. *Am. J. Pathol.* 2005 sept;167(3):663–71.
55. Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2004 oct;22(10):1282–9.
56. Xue T, Cho HC, Akar FG, Tsang S-Y, Jones SP, Marbán E, et al. Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers. *Circulation.* 2005 janv 4;111(1):11–20.
57. Blin G, Nury D, Stefanovic S, Neri T, Guillevic O, Brinon B, et al. A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. *J. Clin. Invest.* 2010 avr 1;120(4):1125–39.
58. Bonnevie L, Bel A, Sabbah L, Al Attar N, Pradeau P, Weill B, et al. Is xenotransplantation of embryonic stem cells a realistic option? *Transplantation.* 2007 févr 15;83(3):333–5.
59. Pouly J, Bruneval P, Mandet C, Proksch S, Peyrard S, Amrein C, et al. Cardiac stem cells in the real world. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2008 mars;135(3):673–8.
60. Bolli R, Chugh AR, D’Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet.* 2011 nov 26;378(9806):1847–57.
61. Yoshida Y, Yamanaka S. iPS cells: a source of cardiac regeneration. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2011 févr;50(2):327–32.
62. Kanashiro-Takeuchi RM, Schulman IH, Hare JM. Pharmacologic and genetic

strategies to enhance cell therapy for cardiac regeneration. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2011 oct;51(4):619–25.

63. Zhang F, Pasumarthi KBS. Embryonic stem cell transplantation: promise and progress in the treatment of heart disease. *BioDrugs.* 2008;22(6):361–74.

64. Beauchamp JR, Morgan JE, Pagel CN, Partridge TA. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J. Cell Biol.* 1999 mars 22;144(6):1113–22.

65. Suzuki K, Murtuza B, Beauchamp JR, Smolenski RT, Varela-Carver A, Fukushima S, et al. Dynamics and mediators of acute graft attrition after myoblast transplantation to the heart. *FASEB J.* 2004 juill;18(10):1153–5.

66. Huard J, Acsadi G, Jani A, Massie B, Karpatis G. Gene transfer into skeletal muscles by isogenic myoblasts. *Hum. Gene Ther.* 1994 août;5(8):949–58.

67. Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat. Med.* 2003 sept;9(9):1195–201.

68. Gnechi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J.* 2006 avr;20(6):661–9.

69. Pasha Z, Wang Y, Sheikh R, Zhang D, Zhao T, Ashraf M. Preconditioning enhances cell survival and differentiation of stem cells during transplantation in infarcted myocardium. *Cardiovasc. Res.* 2008 janv;77(1):134–42.

70. Kubo M, Li T-S, Suzuki R, Ohshima M, Qin S-L, Hamano K. Short-term pretreatment with low-dose hydrogen peroxide enhances the efficacy of bone marrow cells for therapeutic angiogenesis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007 juin;292(6):H2582–8.

71. Wisel S, Khan M, Kuppusamy ML, Mohan IK, Chacko SM, Rivera BK, et al. Pharmacological preconditioning of mesenchymal stem cells with trimetazidine (1-[2,3,4-trimethoxybenzyl]piperazine) protects hypoxic cells against oxidative stress and enhances recovery of myocardial function in infarcted heart through Bcl-2 expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009 mai;329(2):543–50.

72. Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolta JA. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008 août;26(8):2173–82.

73. Suzuki K, Sawa Y, Kagisaki K, Taketani S, Ichikawa H, Kaneda Y, et al. Reduction in myocardial apoptosis associated with overexpression of heat shock protein 70. *Basic Res. Cardiol.* 2000 oct;95(5):397–403.

74. Riederer I, Negroni E, Bigot A, Bencze M, Di Santo J, Aamiri A, et al. Heat shock treatment increases engraftment of transplanted human myoblasts into



immunodeficient mice. *Transplant. Proc.* 2008 mars;40(2):624–30.

75. Suuronen EJ, Kuraitis D, Ruel M. Improving cell engraftment with tissue engineering. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2008;20(2):110–4.

76. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993 mai 14;260(5110):920–6.

77. Dang JM, Leong KW. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006 juill 7;58(4):487–99.

78. Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J. Cell. Mol. Med.* 2005 mars;9(1):72–84.

79. Lode A, Bernhardt A, Gelinsky M. Cultivation of human bone marrow stromal cells on three-dimensional scaffolds of mineralized collagen: influence of seeding density on colonization, proliferation and osteogenic differentiation. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008 oct;2(7):400–7.

80. Miyata T, Taira T, Noishiki Y. Collagen engineering for biomaterial use. *Clin Mater.* 1992;9(3-4):139–48.

81. Simpson D, Liu H, Fan T-HM, Nerem R, Dudley SC Jr. A tissue engineering approach to progenitor cell delivery results in significant cell engraftment and improved myocardial remodeling. *Stem Cells.* 2007 sept;25(9):2350–7.

82. Zhang Y, Thorn S, DaSilva JN, Lamoureux M, DeKemp RA, Beanlands RS, et al. Collagen-based matrices improve the delivery of transplanted circulating progenitor cells: development and demonstration by ex vivo radionuclide cell labeling and in vivo tracking with positron-emission tomography. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2008 nov;1(3):197–204.

83. Miyagi Y, Chiu LLY, Cimini M, Weisel RD, Radisic M, Li R-K. Biodegradable collagen patch with covalently immobilized VEGF for myocardial repair. *Biomaterials.* 2011 févr;32(5):1280–90.

84. Dai W, Hale SL, Kay GL, Jyrala AJ, Kloner RA. Delivering stem cells to the heart in a collagen matrix reduces relocation of cells to other organs as assessed by nanoparticle technology. *Regen Med.* 2009 mai;4(3):387–95.

85. Callegari A, Bollini S, Iop L, Chiavegato A, Torregrossa G, Pozzobon M, et al. Neovascularization induced by porous collagen scaffold implanted on intact and cryoinjured rat hearts. *Biomaterials.* 2007 déc;28(36):5449–61.

86. Kutschka I, Chen IY, Kofidis T, Arai T, von Degenfeld G, Sheikh AY, et al. Collagen matrices enhance survival of transplanted cardiomyoblasts and contribute to functional improvement of ischemic rat hearts. *Circulation.* 2006 juill 4;114(1 Suppl):I167–73.

87. Mokashi SA, Guan J, Wang D, Tchantchaleishvili V, Brigham M, Lipsitz S, et al. Preventing cardiac remodeling: the combination of cell-based therapy and cardiac

support therapy preserves left ventricular function in rodent model of myocardial ischemia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2010 déc;140(6):1374–80.

88. Chan BP, Hui TY, Chan OCM, So K-F, Lu W, Cheung KMC, et al. Photochemical cross-linking for collagen-based scaffolds: a study on optical properties, mechanical properties, stability, and hemato compatibility. *Tissue Eng.* 2007 janv;13(1):73–85.

89. Batorsky A, Liao J, Lund AW, Plopper GE, Stegemann JP. Encapsulation of adult human mesenchymal stem cells within collagen-agarose microenvironments. *Biotechnol. Bioeng.* 2005 nov 20;92(4):492–500.

90. Wei Y, Hu Y, Hao W, Han Y, Meng G, Zhang D, et al. A novel injectable scaffold for cartilage tissue engineering using adipose-derived adult stem cells. *J. Orthop. Res.* 2008 janv;26(1):27–33.

91. Xiong Q, Hill KL, Li Q, Suntharalingam P, Mansoor A, Wang X, et al. A fibrin patch-based enhanced delivery of human embryonic stem cell-derived vascular cell transplantation in a porcine model of postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells.* 2011 févr;29(2):367–75.

92. Christman KL, Vardanian AJ, Fang Q, Sievers RE, Fok HH, Lee RJ. Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculature formation in ischemic myocardium. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004 août 4;44(3):654–60.

93. Liu J, Hu Q, Wang Z, Xu C, Wang X, Gong G, et al. Autologous stem cell transplantation for myocardial repair. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004 août;287(2):H501–11.

94. Dar A, Shachar M, Leor J, Cohen S. Optimization of cardiac cell seeding and distribution in 3D porous alginate scaffolds. *Biotechnol. Bioeng.* 2002 nov 5;80(3):305–12.

95. Landa N, Miller L, Feinberg MS, Holbova R, Shachar M, Freeman I, et al. Effect of injectable alginate implant on cardiac remodeling and function after recent and old infarcts in rat. *Circulation.* 2008 mars 18;117(11):1388–96.

96. Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, Shapiro L, Barbash IM, Battler A, et al. Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation.* 2000 nov 7;102(19 Suppl 3):III56–61.

97. Zammaretti P, Jaconi M. Cardiac tissue engineering: regeneration of the wounded heart. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2004 oct;15(5):430–4.

98. Mirsadraee S, Wilcox HE, Korossis SA, Kearney JN, Watterson KG, Fisher J, et al. Development and characterization of an acellular human pericardial matrix for tissue engineering. *Tissue Eng.* 2006 avr;12(4):763–73.

99. Seif-Naraghi SB, Salvatore MA, Schup-Magoffin PJ, Hu DP, Christman KL. Design



and characterization of an injectable pericardial matrix gel: a potentially autologous scaffold for cardiac tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2010 juin;16(6):2017–27.

100. Ott HC, Matthiesen TS, Goh S-K, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat. Med*. 2008 févr;14(2):213–21.

101. Zhao Z-Q, Puskas JD, Xu D, Wang N-P, Mosunjac M, Guyton RA, et al. Improvement in cardiac function with small intestine extracellular matrix is associated with recruitment of C-kit cells, myofibroblasts, and macrophages after myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2010 mars 23;55(12):1250–61.

102. Kelly DJ, Rosen AB, Schuldt AJT, Kochupura PV, Doronin SV, Potapova IA, et al. Increased myocyte content and mechanical function within a tissue-engineered myocardial patch following implantation. *Tissue Eng Part A*. 2009 août;15(8):2189–201.

103. Bouten CVC, Dankers PYW, Driessen-Mol A, Pedron S, Brizard AMA, Baaijens FPT. Substrates for cardiovascular tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2011 avr 30;63(4-5):221–41.

104. Madden LR, Mortisen DJ, Sussman EM, Dupras SK, Fugate JA, Cuy JL, et al. Proangiogenic scaffolds as functional templates for cardiac tissue engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2010 août 24;107(34):15211–6.

105. Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater*. 2005 juill;4(7):518–24.

106. Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 1998 mai;16(5):224–30.

107. Zhou Q, Zhou J-Y, Zheng Z, Zhang H, Hu S-S. A novel vascularized patch enhances cell survival and modifies ventricular remodeling in a rat myocardial infarction model. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 2010 déc;140(6):1388–96.e1–3.

108. McClurken ME. Saphenous vein is by far superior to PTFE as a femoropopliteal bypass. *Ann. Surg*. 1986 nov;204(5):613–4.

109. Robinson KA, Li J, Mathison M, Redkar A, Cui J, Chronos NAF, et al. Extracellular matrix scaffold for cardiac repair. *Circulation*. 2005 août 30;112(9 Suppl):I135–43.

110. Marsano A, Maidhof R, Wan LQ, Wang Y, Gao J, Tandon N, et al. Scaffold stiffness affects the contractile function of three-dimensional engineered cardiac constructs. *Biotechnol. Prog*. 2010 oct;26(5):1382–90.

111. Engelmayer GC Jr, Cheng M, Bettinger CJ, Borenstein JT, Langer R, Freed LE. Accordion-like honeycombs for tissue engineering of cardiac anisotropy. *Nat Mater*. 2008 déc;7(12):1003–10.

112. Akhyari P, Fedak PWM, Weisel RD, Lee T-YJ, Verma S, Mickle DAG, et al.

Mechanical stretch regimen enhances the formation of bioengineered autologous cardiac muscle grafts. *Circulation*. 2002 sept 24;106(12 Suppl 1):I137–42.

113. Habib M, Shapira-Schweitzer K, Caspi O, Gepstein A, Arbel G, Aronson D, et al. A combined cell therapy and in-situ tissue-engineering approach for myocardial repair. *Biomaterials*. 2011 oct;32(30):7514–23.

114. McDevitt TC, Woodhouse KA, Hauschka SD, Murry CE, Stayton PS. Spatially organized layers of cardiomyocytes on biodegradable polyurethane films for myocardial repair. *J Biomed Mater Res A*. 2003 sept 1;66(3):586–95.

115. Furuta A, Miyoshi S, Itabashi Y, Shimizu T, Kira S, Hayakawa K, et al. Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, in vivo. *Circ. Res*. 2006 mars 17;98(5):705–12.

116. Masuda S, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering for heart tissue repair. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2008 janv 14;60(2):277–85.

117. Shimizu T, Sekine H, Yang J, Isoi Y, Yamato M, Kikuchi A, et al. Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *FASEB J*. 2006 avr;20(6):708–10.

118. Kino-Oka M, Ngo TX, Nagamori E, Takezawa Y, Miyake Y, Sawa Y, et al. Evaluation of vertical cell fluidity in a multilayered sheet of skeletal myoblasts. *J. Biosci. Bioeng.* [Internet]. 2011 oct 19 [cité 2012 janv 8];Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22018737>

119. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat. Med*. 2006 avr;12(4):459–65.

120. Miyagawa S, Sawa Y, Sakakida S, Taketani S, Kondoh H, Memon IA, et al. Tissue cardiomyoplasty using bioengineered contractile cardiomyocyte sheets to repair damaged myocardium: their integration with recipient myocardium. *Transplantation*. 2005 déc 15;80(11):1586–95.

121. Kondoh H, Sawa Y, Miyagawa S, Sakakida-Kitagawa S, Memon IA, Kawaguchi N, et al. Longer preservation of cardiac performance by sheet-shaped myoblast implantation in dilated cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc. Res*. 2006 févr 1;69(2):466–75.

122. Sawa Y. [Myocardial regeneration for heart failure]. *Nippon Rinsho*. 2010 avr;68(4):719–25.

123. Blakeney BA, Tambralli A, Anderson JM, Andukuri A, Lim D-J, Dean DR, et al. Cell infiltration and growth in a low density, uncompressed three-dimensional electrospun nanofibrous scaffold. *Biomaterials*. 2011 févr;32(6):1583–90.

124. Kim D-H, Lipke EA, Kim P, Cheong R, Thompson S, Delannoy M, et al. Nanoscale

cues regulate the structure and function of macroscopic cardiac tissue constructs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010 janv 12;107(2):565–70.

125. Dimmeler S, Leri A. Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. *Circ. Res.* 2008 juin 6;102(11):1319–30.

126. Segers VFM, Tokunou T, Higgins LJ, MacGillivray C, Gannon J, Lee RT. Local delivery of protease-resistant stromal cell derived factor-1 for stem cell recruitment after myocardial infarction. *Circulation.* 2007 oct 9;116(15):1683–92.

127. Davis ME, Hsieh PCH, Takahashi T, Song Q, Zhang S, Kamm RD, et al. Local myocardial insulin-like growth factor 1 (IGF-1) delivery with biotinylated peptide nanofibers improves cell therapy for myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006 mai 23;103(21):8155–60.

128. Zvibel I, Smets F, Soriano H. Anoikis: roadblock to cell transplantation? *Cell Transplant.* 2002;11(7):621–30.

129. Robey TE, Saiget MK, Reinecke H, Murry CE. Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2008 oct;45(4):567–81.

130. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* 2007 janv;32(1):37–43.

131. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N. Engl. J. Med.* 2009 oct 15;361(16):1570–83.

132. Fukushima S, Varela-Carver A, Coppen SR, Yamahara K, Felkin LE, Lee J, et al. Direct intramyocardial but not intracoronary injection of bone marrow cells induces ventricular arrhythmias in a rat chronic ischemic heart failure model. *Circulation.* 2007 mai 1;115(17):2254–61.

133. Yang J, Yamato M, Nishida K, Ohki T, Kanzaki M, Sekine H, et al. Cell delivery in regenerative medicine: the cell sheet engineering approach. *J Control Release.* 2006 nov 28;116(2):193–203.

134. Memon IA, Sawa Y, Fukushima N, Matsumiya G, Miyagawa S, Taketani S, et al. Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2005 nov;130(5):1333–41.

135. Neuss S, Apel C, Buttler P, Denecke B, Dhanasingh A, Ding X, et al. Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering. *Biomaterials.* 2008 janv;29(3):302–13.

136. Nugent HM, Edelman ER. Endothelial implants provide long-term control of vascular repair in a porcine model of arterial injury. *J. Surg. Res.* 2001 août;99(2):228–34.

137. Methe H, Nugent HM, Groothuis A, Seifert P, Sayegh MH, Edelman ER. Matrix

embedding alters the immune response against endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation*. 2005 août 30;112(9 Suppl):I89–95.

138. Ponticiello MS, Schinagl RM, Kadiyala S, Barry FP. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *J. Biomed. Mater. Res*. 2000 nov;52(2):246–55.

139. Suuronen EJ, Veinot JP, Wong S, Kapila V, Price J, Griffith M, et al. Tissue-engineered injectable collagen-based matrices for improved cell delivery and vascularization of ischemic tissue using CD133+ progenitors expanded from the peripheral blood. *Circulation*. 2006 juill 4;114(1 Suppl):I138–44.

140. Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin J-T, Audinat E, Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003 juin 24;100(13):7808–11.

141. Formigli L, Perna A-M, Meacci E, Cinci L, Margheri M, Nistri S, et al. Paracrine effects of transplanted myoblasts and relaxin on post-infarction heart remodelling. *J. Cell. Mol. Med*. 2007 oct;11(5):1087–100.

142. Perez-Ilzarbe M, Agbulut O, Pelacho B, Ciorba C, San Jose-Eneriz E, Desnos M, et al. Characterization of the paracrine effects of human skeletal myoblasts transplanted in infarcted myocardium. *Eur. J. Heart Fail*. 2008 nov;10(11):1065–72.

143. Timmers L, Lim SK, Arslan F, Armstrong JS, Hoefer IE, Doevendans PA, et al. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Res*. 2007 nov;1(2):129–37.

144. Cho H-J, Lee N, Lee JY, Choi YJ, Li M, Wecker A, et al. Role of host tissues for sustained humoral effects after endothelial progenitor cell transplantation into the ischemic heart. *J. Exp. Med*. 2007 déc 24;204(13):3257–69.

145. Charbord P, Casteilla L. [Human mesenchymal stem cell biology]. *Med Sci (Paris)*. 2011 mars;27(3):261–7.

146. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Tan J, Fishbein MC, Chen P-S, et al. IFATS collection: Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. *Stem Cells*. 2009 janv;27(1):230–7.

147. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004 mars 16;109(10):1292–8.

148. English K, French A, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? *Cell Stem Cell*. 2010 oct 8;7(4):431–42.

149. Sekiya N, Matsumiya G, Miyagawa S, Saito A, Shimizu T, Okano T, et al. Layered implantation of myoblast sheets attenuates adverse cardiac remodeling of the infarcted

heart. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2009 oct;138(4):985–93.

150. Qu H-ping, Qin S, Min D, Tang Y-qing. [The effects of earlier resuscitation on following therapeutic response in sepsis with hypoperfusion]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 2006 sept 1;44(17):1193–6.

151. Song H, Hwang HJ, Chang W, Song B-W, Cha M-J, Kim I-K, et al. Cardiomyocytes from phorbol myristate acetate-activated mesenchymal stem cells restore electromechanical function in infarcted rat hearts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011 janv 4;108(1):296–301.

152. Sekine H, Shimizu T, Okano T. Myocardial tissue engineering: toward a bioartificial pump. *Cell Tissue Res.* [Internet]. 2011 nov 18 [cité 2012 janv 8];Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22095463>

153. Baldazzi F, Jørgensen E, Ripa RS, Kastrup J. Release of biomarkers of myocardial damage after direct intramyocardial injection of genes and stem cells via the percutaneous transluminal route. *Eur. Heart J.* 2008 août;29(15):1819–26.

154. Masuda S, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering for heart tissue repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008 janv 14;60(2):277–85.

155. Shimizu T, Sekine H, Yang J, Isoi Y, Yamato M, Kikuchi A, et al. Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *FASEB J.* 2006 avr;20(6):708–10.

156. Colombatti A, Doliana R, Bot S, Canton A, Mongiat M, Mungiguerra G, et al. The EMILIN protein family. *Matrix Biol.* 2000 août;19(4):289–301.

157. Gullberg DE, Lundgren-Akerlund E. Collagen-binding I domain integrins--what do they do? *Prog Histochem Cytochem.* 2002;37(1):3–54.

158. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992 avr 3;69(1):11–25.

159. Zanetti M, Braghetta P, Sabatelli P, Mura I, Doliana R, Colombatti A, et al. EMILIN-1 deficiency induces elastogenesis and vascular cell defects. *Mol. Cell. Biol.* 2004 janv;24(2):638–50.

160. Creemers EEJM, Davis JN, Parkhurst AM, Leenders P, Dowdy KB, Hapke E, et al. Deficiency of TIMP-1 exacerbates LV remodeling after myocardial infarction in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003 janv;284(1):H364–71.

161. Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal.* 2008;1(27):re6.

162. Tateishi K, Ashihara E, Honsho S, Takehara N, Nomura T, Takahashi T, et al. Human cardiac stem cells exhibit mesenchymal features and are maintained through Akt/GSK-3beta signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007 janv 19;352(3):635–

41.

163. Matsuura K, Honda A, Nagai T, Fukushima N, Iwanaga K, Tokunaga M, et al. Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *J. Clin. Invest.* 2009 août;119(8):2204–17.

164. Jorgensen C, Deschaseaux F, Planat-Benard V, Gabison E. [Mesenchymal stem cells: A therapeutic update]. *Med Sci (Paris)*. 2011 mars;27(3):275–84.

165. Hong SJ, Traktuev DO, March KL. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010 févr;15(1):86–91.

166. Horwitz EM, Dominici M. How do mesenchymal stromal cells exert their therapeutic benefit? *Cytotherapy*. 2008;10(8):771–4.

167. Ménard C, Tarte K. [Immunosuppression and mesenchymal stem cells: back to the future]. *Med Sci (Paris)*. 2011 mars;27(3):269–74.

168. Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2004 oct;22(10):1282–9.

169. Song H, Yoon C, Kattman SJ, Dengler J, Massé S, Thavaratnam T, et al. Interrogating functional integration between injected pluripotent stem cell-derived cells and surrogate cardiac tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010 févr 23;107(8):3329–34.

170. Brito-Martins M, Harding SE, Ali NN. beta(1)- and beta(2)-adrenoceptor responses in cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells: comparison with failing and non-failing adult human heart. *Br. J. Pharmacol.* 2008 févr;153(4):751–9.

171. Caspi O, Huber I, Kehat I, Habib M, Arbel G, Gepstein A, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007 nov 6;50(19):1884–93.

172. Dai W, Field LJ, Rubart M, Reuter S, Hale SL, Zweigerdt R, et al. Survival and maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2007 oct;43(4):504–16.

173. Dolnikov K, Shilkrot M, Zeevi-Levin N, Gerecht-Nir S, Amit M, Danon A, et al. Functional properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: intracellular Ca<sup>2+</sup> handling and the role of sarcoplasmic reticulum in the contraction. *Stem Cells*. 2006 févr;24(2):236–45.

174. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* 2001 août;108(3):407–14.



175. Kofidis T, Lebl DR, Swijnenburg R-J, Greeve JM, Klima U, Gold J, et al. Allopurinol/uricase and ibuprofen enhance engraftment of cardiomyocyte-enriched human embryonic stem cells and improve cardiac function following myocardial injury. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006 janv;29(1):50–5.
176. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat. Biotechnol*. 2007 sept;25(9):1015–24.
177. Leor J, Gerecht S, Cohen S, Miller L, Holbova R, Ziskind A, et al. Human embryonic stem cell transplantation to repair the infarcted myocardium. *Heart*. 2007 oct;93(10):1278–84.
178. Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, et al. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation*. 2003 juin 3;107(21):2733–40.
179. Sartiani L, Bettiol E, Stillitano F, Mugelli A, Cerbai E, Jacon ME. Developmental changes in cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells: a molecular and electrophysiological approach. *Stem Cells*. 2007 mai;25(5):1136–44.
180. Smits AM, van Laake LW, den Ouden K, Schreurs C, Szuhai K, van Echteld CJ, et al. Human cardiomyocyte progenitor cell transplantation preserves long-term function of the infarcted mouse myocardium. *Cardiovasc. Res*. 2009 août 1;83(3):527–35.
181. Tomescot A, Leschik J, Bellamy V, Dubois G, Messas E, Bruneval P, et al. Differentiation in vivo of cardiac committed human embryonic stem cells in postmyocardial infarcted rats. *Stem Cells*. 2007 sept;25(9):2200–5.
182. van Laake LW, Passier R, Monshouwer-Kloots J, Verkleij AJ, Lips DJ, Freund C, et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction. *Stem Cell Res*. 2007 oct;1(1):9–24.
183. Xie C-Q, Zhang J, Xiao Y, Zhang L, Mou Y, Liu X, et al. Transplantation of human undifferentiated embryonic stem cells into a myocardial infarction rat model. *Stem Cells Dev*. 2007 févr;16(1):25–9.
184. Yamada S, Nelson TJ, Crespo-Diaz RJ, Perez-Terzic C, Liu X-K, Miki T, et al. Embryonic stem cell therapy of heart failure in genetic cardiomyopathy. *Stem Cells*. 2008 oct;26(10):2644–53.
185. van Laake LW, Passier R, den Ouden K, Schreurs C, Monshouwer-Kloots J, Ward-van Oostwaard D, et al. Improvement of mouse cardiac function by hESC-derived cardiomyocytes correlates with vascularity but not graft size. *Stem Cell Res*. 2009 nov;3(2-3):106–12.
186. Singla DK, McDonald DE. Factors released from embryonic stem cells inhibit

apoptosis of H9c2 cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007 sept;293(3):H1590–5.

187. Bonaros N, Rauf R, Wolf D, Margreiter E, Tzankov A, Schlechta B, et al. Combined transplantation of skeletal myoblasts and angiopoietic progenitor cells reduces infarct size and apoptosis and improves cardiac function in chronic ischemic heart failure. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2006 déc;132(6):1321–8.

188. Memon IA, Sawa Y, Miyagawa S, Taketani S, Matsuda H. Combined autologous cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and bone marrow cells in canine hearts for ischemic cardiomyopathy. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2005 sept;130(3):646–53.

189. Li T-S, Takahashi M, Ohshima M, Qin S-L, Kubo M, Muramatsu K, et al. Myocardial repair achieved by the intramyocardial implantation of adult cardiomyocytes in combination with bone marrow cells. *Cell Transplant.* 2008;17(6):695–703.

190. Min J-Y, Sullivan MF, Yang Y, Zhang J-P, Converso KL, Morgan JP, et al. Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs. *Ann. Thorac. Surg.* 2002 nov;74(5):1568–75.

191. Winter EM, van Oorschot AAM, Hogers B, van der Graaf LM, Doevendans PA, Poelmann RE, et al. A new direction for cardiac regeneration therapy: application of synergistically acting epicardium-derived cells and cardiomyocyte progenitor cells. *Circ Heart Fail.* 2009 nov;2(6):643–53.

192. Stevens KR, Kreutziger KL, Dupras SK, Korte FS, Regnier M, Muskheli V, et al. Physiological function and transplantation of scaffold-free and vascularized human cardiac muscle tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009 sept 29;106(39):16568–73.

193. Di Meglio F, Castaldo C, Nurzynska D, Romano V, Miraglia R, Bancone C, et al. Epithelial-mesenchymal transition of epicardial mesothelium is a source of cardiac CD117-positive stem cells in adult human heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010 nov;49(5):719–27.

194. Sekine H, Shimizu T, Hobo K, Sekiya S, Yang J, Yamato M, et al. Endothelial cell coculture within tissue-engineered cardiomyocyte sheets enhances neovascularization and improves cardiac function of ischemic hearts. *Circulation.* 2008 sept 30;118(14 Suppl):S145–52.

195. Bel A, Planat-Bernard V, Saito A, Bonnevie L, Bellamy V, Sabbah L, et al. Composite cell sheets: a further step toward safe and effective myocardial regeneration by cardiac progenitors derived from embryonic stem cells. *Circulation.* 2010 sept 14;122(11 Suppl):S118–23.

196. Lesman A, Habib M, Caspi O, Gepstein A, Arbel G, Levenberg S, et al. Transplantation of a tissue-engineered human vascularized cardiac muscle. *Tissue Eng Part A.* 2010 janv;16(1):115–25.



197. Sekine H, Shimizu T, Kosaka S, Kobayashi E, Okano T. Cardiomyocyte bridging between hearts and bioengineered myocardial tissues with mesenchymal transition of mesothelial cells. *J. Heart Lung Transplant.* 2006 mars;25(3):324–32.
198. Choi YS, Matsuda K, Dusting GJ, Morrison WA, Dilley RJ. Engineering cardiac tissue in vivo from human adipose-derived stem cells. *Biomaterials.* 2010 mars;31(8):2236–42.
199. Puymirat E, Geha R, Tomescot A, Bellamy V, Larghero J, Trinquart L, et al. Can mesenchymal stem cells induce tolerance to cotransplanted human embryonic stem cells? *Mol. Ther.* 2009 janv;17(1):176–82.
200. Hansson EM, Lindsay ME, Chien KR. Regeneration next: toward heart stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell.* 2009 oct 2;5(4):364–77.
201. Zhou B, Pu WT. Epicardial epithelial-to-mesenchymal transition in injured heart. *J. Cell. Mol. Med.* 2011 déc;15(12):2781–3.
202. Sant S, Khademhosseini A. Fabrication and characterization of tough elastomeric fibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2010;2010:3546–8.

## **Annexes**



# THE ANNALS OF THORACIC SURGERY



## **Cell Delivery: Intramyocardial Injections or Epicardial Deposition? A Head-to-Head Comparison**

Hadhami Hamdi, Akira Furuta, Valérie Bellamy, Alain Bel, Etienne Puymirat, Séverine  
Peyrard, Onnik Agbulut and Philippe Menasché

*Ann Thorac Surg* 2009;87:1196-1203

DOI: 10.1016/j.athoracsur.2008.12.074

The online version of this article, along with updated information and services, is  
located on the World Wide Web at:

<http://ats.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/87/4/1196>

*The Annals of Thoracic Surgery* is the official journal of The Society of Thoracic Surgeons and the Southern Thoracic Surgical Association. Copyright © 2009 by The Society of Thoracic Surgeons. Print ISSN: 0003-4975; eISSN: 1552-6259.

# Cell Delivery: Intramyocardial Injections or Epicardial Deposition? A Head-to-Head Comparison

Hadhami Hamdi, MSc, Akira Furuta, MD, Valérie Bellamy, Alain Bel, MD, Etienne Puymirat, MD, Séverine Peyrard, MSc, Onnik Agbulut, PhD, and Philippe Menasché, MD, PhD

INSERM U 633, Laboratory of Surgical Research, Paris; Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of Cardiovascular Surgery; Ecole de Chirurgie, Paris; Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Epidemiology and Clinical Research Unit; INSERM CIE4, Paris; Laboratoire de Stress et Pathologies du Cytosquelette, EA300, Université Paris Diderot, Paris; Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of Cardiovascular Surgery; Université Paris Descartes; INSERM U 633, Paris, France

**Background.** Multiple needle-based injections of cells in the myocardium are associated with a low engraftment rate, which may limit the benefits of the procedure. This study used skeletal myoblasts to perform a head-to-head comparison of conventional injections with epicardial deposition of scaffold-embedded cells.

**Methods.** Four weeks after ligation-induced myocardial infarction, 40 rats were randomly allocated to receive intramyocardial injections of 5 million human skeletal myoblasts or control medium or to have the infarcted area covered with either a bilayer myoblast cell sheet prepared from a fibrin-coated culture plate or a myoblast-seeded collagen sponge (Gelfoam; Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, MI). End points, assessed after 1 month, included left ventricular function blindly measured by echocardiography, quantification of cell engraftment by quantitative real-time polymerase chain reaction and immunostaining, histologic assessment of fibrosis and angiogenesis, and tissue levels of host-specific angiogenic and antifibrotic cytokines.

**Results.** Compared with control medium- or myoblast-injected hearts, those receiving the two cell constructs demonstrated the highest recoveries of left ventricular function ( $p = 0.004$  versus controls). Both myoblast cell sheets and myoblast-seeded Gelfoam sponges also resulted in significantly greater angiogenesis compared with controls. The Gelfoam group was associated with the best outcome with regard to the number of engrafted donor cells ( $p = 0.03$  versus myoblasts) and the reduction of fibrosis ( $p = 0.02$  and  $p = 0.04$  versus the control and myoblast groups, respectively).

**Conclusions.** Compared with injections, delivery of myoblasts in a construct overlaying the infarcted area is associated with better graft functionality, possibly because of maintenance of improved cell patterning. The cell-seeded Gelfoam construct was found to feature a user-friendly, reproducible, and atraumatic technique.

(Ann Thorac Surg 2009;87:1196–204)

© 2009 by The Society of Thoracic Surgeons

During the last decade, the accumulating experience with cardiac cell therapy has allowed us to recognize that the outcome of the procedure was not only dependent on the cell type but also on the methods used for transferring cells and ensuring their optimal engraftment [1]. Consequently, basic research on cell biology has been increasingly paralleled by more technology-oriented studies aimed at optimizing graft delivery and survival. In the setting of surgical applications, this has led us to consider non-injection-based techniques entailing the epicardial coverage of the infarct area by cellularized scaffolds [2–4] with the hope that these patches would reduce mechanical leakage of the donor cells and promote their appropriate patterning with respect to

cell-to-cell and cell-to-extracellular matrix contacts, thereby reducing cell death that occurs when anchorage-dependent cells are detached from the extracellular matrix [5]. So far, however, most of these studies have failed to provide a head-to-head comparison of these new approaches with the conventional needle-based injection technique. The present study was designed to address this issue by comparatively assessing, in a rat model of myocardial infarction, the effects of multiple skeletal myoblast injections with those of two epicardially delivered constructs, of which one was made of a scaffold-free myoblast cell sheet and the other of a myoblast-seeded gelatin sponge.

## Material and Methods

All experiments were performed in accordance with the “Principles of Laboratory Animal Care” formulated by the National Society for Medical Research and the

Accepted for publication Dec 24, 2008.

Address correspondence to Dr Menasché, Department of Cardiovascular Surgery, Hôpital Européen Georges Pompidou, 20, rue Leblanc, Paris, 75015, France; e-mail: philippe.menasche@egp.aphp.fr.

“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Science, National Research Council, and published by the National Academy Press, revised 1996.

### Cell Cultures

Primary muscle cell cultures were prepared from human biopsies taken during orthopaedic operations after institutional approval. The general methodology has already been described [6] and, in brief, entailed digestion of the biopsy by collagenase and trypsin followed by culture in a myogenic-specific medium based on a modification of MCDB120 supplemented with fetal bovine serum, basic fibroblast growth factor, dexamethasone, penicillin, and streptomycin. After expansion until passage 5, aliquots of cells were cryopreserved until the time of use. They were then thawed, resuspended for 4 days in the same medium, and collected by trypsinization.

### Preparation of Myoblast Cell Sheets

Biodegradable polymerized fibrin-coated dishes were prepared as described previously [7]. Briefly, a mixture of human fibrinogen (90 mg), thrombin (4 U), aprotinin (3,000 U), and calcium chloride (3.52 mg) was diluted in 16 mL of saline solution, and 0.3 mL of this solution was spread onto 35-mm culture dishes (Corning, Acton, MA). Polymerization was achieved after 2 hours at room temperature. Myoblasts were then plated on the dishes at a density of  $6.25 \times 10^4/\text{cm}^2$  in 2.6 mL of a special medium supplemented with 20% fetal bovine serum, 5.0 ng/mL basic fibroblast growth factor, 5.0 ng/mL dexamethasone, and antibiotics (penicillin, streptomycin, and amphotericin). The cell-coated dishes were incubated at 37°C in a humidified atmosphere, and myoblast cell sheets were obtained 9 days later, after the fibrin layer had been gradually degraded by the proteases secreted from the cultured cells. At the time of transplantation, the cell sheets were detached from the plates with a cell scraper. Two of them were overlaid and preincubated to allow stabilization for 30 minutes. To avoid them from being damaged, the stacked cell sheets were mounted onto a collagen film (CLF-01 Koken, Tokyo, Japan), which allowed their easy delivery to the host heart. Immediately after transplantation, the collagen film was peeled off the myoblast cell sheets, which adhered to the epicardial surface of the infarcted area.

Five nontransplanted myoblast sheets were trypsinized and assessed for viability by trypan blue exclusion at five different times (0, 15, 30, 60, and 120 minutes). Other sheets were either fixed in cold methanol (–20°C, 10 minutes) and then assessed for the presence of myogenic cells by desmin immunostaining (1:100; DakoCytomation, Glostrup, Denmark) after 9 days of plating or tested for cell proliferation by Ki-67 (1:30; Abcam, Cambridge, MA) at days 1 (negative control), 9, and 21 after plating.

### Preparation of Cell-Seeded Gelfoam Sponges

Gelfoam sheets (Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, MI) were cut into  $2.5 \times 1.0 \times 0.5 \text{ cm}^3$  blocks, hydrated in phosphate-buffered saline for 30 minutes, and seeded with human myoblasts at a density of  $0.8 \times 10^5$  (6 drops, one in each corner and two in the central part of the Gelfoam piece). The cell-loaded Gelfoam blocks were then incubated for 3 hours at 37°C with 5%  $\text{CO}_2$  before transfer into a six-well plate containing 3 to 5 mL of medium supplemented with 20% fetal bovine serum, 5.0 ng/mL basic fibroblast growth factor, and 1% combined antibiotics in each well. The medium was changed every 72 hours, and the cell-seeded scaffolds were grafted after 3 weeks. Control nontransplanted sponges were digested with collagenase (0.5 mg/mL, Type 1A; Sigma, St. Louis, MO), and after centrifugation the cell pellet was assessed for viability by trypan blue exclusion. Other sponges were frozen and subsequently cryosectioned for visualization of myogenic cells by immunostaining against desmin.

### Myocardial Infarction Model

Female Wistar rats weighing 250 g were anesthetized with 2% to 3% isoflurane (Baxter, Maurepas, France). After tracheal intubation, mechanical ventilation (Alpha-lab; Minerve, Esternay, France) was set at a rate of 70/min and with a 2-mL average insufflation volume. The heart was approached through a left thoracotomy, and a myocardial infarction was created by permanent ligation of the left coronary artery with a 7-0 polypropylene snare (Ethicon, Somerville, NJ).

Four weeks after creation of infarction, rats underwent a baseline echocardiographic assessment of left ventricular (LV) function, and only those with an ejection fraction between 0.20 and 0.45 were selected for the trial. After a median sternotomy, these animals were randomly allocated to receive intramyocardial injections of culture medium (controls,  $n = 10$ ) or skeletal myoblasts ( $5 \times 10^6$ ,  $n = 10$ ) or to undergo epicardial deposition of either a 9-day cultured myoblast cell bilayer sheet ( $n = 10$ ) or a myoblast-seeded Gelfoam sponge ( $n = 10$ ) overlaying the infarcted area. All injections consisted of a 150- $\mu\text{L}$  volume delivered in three sites in the core and at the borders of the scar by using a 29-gauge needle. Although the myoblast sheets spontaneously adhered to the surface of the heart, the Gelfoam sponges had to be secured by two 7-0 polypropylene stitches. Immunosuppressive therapy, consisting of one daily 10 mg/kg subcutaneous shot of cyclosporin A, was started on the day of transplantation and continued thereafter until sacrifice.

### Assessment of Left Ventricular Function

Pretransplantation and posttransplantation cardiac function was evaluated before transplantation and 1 month thereafter by transthoracic echocardiography (Sequoia 516, equipped with a 15-MHz transducer; Siemens, Mountain View, CA) in animals sedated with 2% isoflurane. Parasternal long- and short-axis views were obtained with both

M-mode and two-dimensional images. Left ventricular end-diastolic surface, LV end-systolic surface, LV end-diastolic length, and LV end-systolic length were measured on parasternal long-axis views with two-dimensional images. Volumes were calculated as  $(8/3\pi) \times (\text{surface}^2/\text{length})$ . Ejection fraction was calculated as  $(\text{LV end-diastolic volume} - \text{LV end-systolic volume})/\text{LV end-systolic volume}$ . All measurements were made in triplicate and averaged by an investigator blinded to the treatment group.

#### Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

Because the primary objective of this study was to assess engraftment, the majority of hearts (7 of 10 in each group) were processed for quantification of cell numbers by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Total RNA was extracted from rat myocardium using the RNA NOW 60-minute one-step mRNA reagent (Biogentex, Seabrook, TX), reverse-transcribed from an oligo(16)dT with Mu-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy, France), and qRT-PCR was performed with SYBR Green mix (Roche, Mannheim, Germany) on a Light Cycler FastStart DNA Master Plus (Roche). The human-specific primer sequences (HuG6PDH-R) were (forward/reverse) 5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-GAG-3'/5'-TCGCCCACTTGATTTGTCAGG-3'.

To assess whether delivery of donor cells had triggered host-associated angiogenic or antifibrotic pathways, qRT-PCR was also used to quantify transcripts for rat-specific vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and hepatocyte growth factor (HGF). The primer sequences were (forward/reverse) VEGF-A: 5'-tcaccaagcagcacatag-3'/5'-ttgacctttccctttctc-3'; and HGF: 5'-TATTTACGGC-TGGGGCTACA3'/5'-ACGACCAGGAACAATGACAC-3'.

The messenger RNA expression levels of target genes were normalized to hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and transcription factor II D signals as housekeeping genes, and all experiments were performed in triplicate.

#### Cytokine Array

Frozen heart samples were placed into an ice-cold homogenization buffer containing (in mmol/L) 20 Tris (pH 7.6), 250 NaCl, 3 EDTA, 3 EGTA, 0.5% nonyl phenoxypolyethoxyethanol 40, 2 dithiothreitol, 10 Na-orthovanadate, 10 NaF, 10 glycerophosphate, and an antiprotease inhibitor cocktail (Sigma). Samples were homogenized and then centrifuged at 12,000g for 30 minutes at 0°C. Protein concentration was measured by the method of Bradford using bovine serum albumin as a standard. Cytokine antibody arrays were carried out according to the manufacturer's instructions (Ray Biotech, Norcross, GA) using 200 µg of protein per sample. The system allows us to screen multiple mediators, including cytokine-induced neutrophil chemoattractants 2 and 3, ciliary neurotrophic factor, fractalkine, LPS-induced CXC chemokine, leptin, monocyte chemotactic protein 1, macrophage inflammatory protein 3α, nerve growth factor β, granulocyte macrophage-colony stimulating factor, interferon-γ, tissue inhibitor of metallopro-

teinase 1, tumor necrosis factor α, VEGF, and interleukins 1a, 1b, 4, 6, and 10. The expression of stroma-derived factor 1α and placenta growth factor was also tested separately. The intensity of the different spots was determined using a densitometric software (Scion Image, NIH, Bethesda, MD).

#### Western Blot Analysis

Tissue lysates (40 µg/lane) were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis before electrophoretic transfer onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA). Western-blot analysis was carried out using anti-rat VEGF-A (Santa Cruz Technology, Santa Cruz, CA) and anti-rat HGF (Euromedex, Souffelweyersheim, France) antibodies. Antibody reacting bands were visualized after development with peroxidase-conjugated secondary antibodies (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) and a chemiluminescent detection system (ECL-Plus; GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). Bands were quantified by densitometric software (Scion Image, NIH).

#### Histologic and Immunohistochemical Assessment

After the last echocardiographic assessment, three hearts in each group were separated in two halves by a short-axis section through the midportion of the infarcted area. The blocks were immediately fixed in Tissue-Tek Optimal Temperature Cutting medium (Sakura, Torrance, CA) and frozen at –180°C in liquid nitrogen until they were sliced into 7-µm-thick cryosections using an ultramicrotome (LM 1850; Leica, Wetzlar, Germany). Forty fields (10 per heart) randomly spanning the entire infarct area were analyzed with a microscope (Leica DMIL) equipped with a digital camera (Qicam; Qimaging, Burnaby, BC, Canada). Hematoxylin and eosin staining was used to delineate the area of infarction. The presence of human cells was detected by immunofluorescence using an antibody directed against a specific nuclear human protein (lamin A/C; Novocastra, A Menarini Diagnostics, Rungis, France) at a magnification ×40. Myogenic cells, macrophages, and T lymphocytes were identified by immunostaining using antibodies against fast skeletal myosin (clone My32, 1:200; Sigma), CD68 (clone ED-1, 1:100; Serotec, Oxford, UK), and CD3 (1:75; DakoCytomation, Trappes, France), respectively. The proteins were revealed using fluorescein isothiocyanate- or Texas red-conjugated secondary antibodies. The presence of these different cells in the myocardial tissue was then graded according to a semiquantitative score where 1+, 2+, and 3+ corresponded to minimal, moderate, and massive infiltration, respectively. Endothelial cells were immunostained with a rat-specific antibody (RECA, clone HIS52, 1/30; Serotec, Dusseldorf, Germany) conjugated with a biotinylated anti-mouse IgG secondary antibody (Vector, Burlingame, CA). Angiogenesis was then computed by counting RECA-positive cells at a magnification of ×10. The extent of fibrosis was assessed by Sirius red staining at a magnification ×5. Digital images were then processed with Metamorph software (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA), and



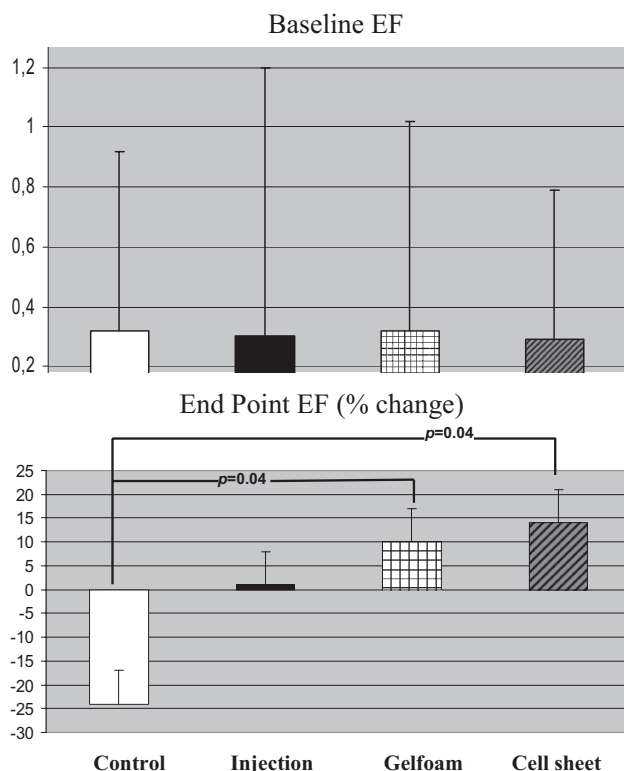


Fig 1. Baseline left ventricular ejection fraction (EF) in all groups and percentage of change 1 month after transplantation. Data are given as mean  $\pm$  standard deviation.

fibrosis was expressed as the ratio between the area of scar tissue to the LV area. Nuclei were counterstained with hematoxylin or 4', 6-diamidino-2-phenylindole.

### Data Analysis

Data are summarized using median (minimum; maximum) or mean ( $\pm$ 1 standard deviation) values. The changes in LV function variables (LV ejection fraction, LV end-diastolic volume, LV end-systolic volume) were compared among treatment groups using a parametric analysis of covariance with the presacrifice measurement as outcome and the pretransplantation measurement and treatment groups as covariates. The mean numbers of vessels per square millimeter and the mean percentages of fibrosis were compared among groups using a mixed model for clustered continuous data, taking into account the intraheart correlation (as multiple slices were used for a single heart) or a nonparametric Wilcoxon rank sum test incorporating the cluster effect. The percentages of fibrosis were log-transformed to satisfy hypotheses required for the parametric model. Statistical significance was set at the 5% threshold, and all statistical analyses were performed with the SAS statistical software version 9.1 (Cary, NC.).

## Results

### In Vitro Data

Proliferation of myoblasts in the cell sheet, as assessed by Ki-67 immunostaining, peaked at day 9 but sharply

dropped thereafter, hence the choice to graft the sheets at the 9-day time point. At this time, the sheets had become so sticky that they could not be trypsinized for cell counting, but the growth kinetics suggested that each of them contained approximately 1 million myoblasts so that a twofold greater number of cells were delivered to the heart once two sheets had been piled one on top of the other. Proliferation of myoblasts within the Gelfoam sponge was important. Three of these scaffolds, initially seeded with 80,000 cells, were tested for the presence of myoblasts by desmin staining and, after 3 weeks, the number of cells was found to have increased to approximately  $3 \times 10^6$ . In all groups, pretransplantation cell viability was greater than 90%.

### Functional Outcome

Baseline LV ejection fraction was not different among the four groups and averaged (mean  $\pm$  standard deviation)  $0.32\% \pm 0.7\%$ ,  $0.30\% \pm 0.9\%$ ,  $0.32\% \pm 0.7\%$ , and  $0.29\% \pm 0.5\%$  in the control, myoblast, Gelfoam, and cell sheet groups, respectively ( $p = 0.75$ ). However, the patterns of changes were then divergent as LV function deteriorated compared with baseline values in control hearts, stabilized in the myoblast group, and increased in the two cell construct groups (Fig 1). After adjustment for baseline values, the posttransplantation LV ejection fraction (mean and 95% confidence interval) was thus found to be higher, although not significantly, in the myoblast group compared with controls (estimated difference of means:  $7.2\% [-0.6 \text{ to } 15.0]$ ,  $p = 0.08$ ), whereas the best recoveries were yielded by the Gelfoam (Pharmacia & Upjohn) and cell sheet groups (estimated difference of means with controls,  $10.3\% [2.5 \text{ to } 18.0]$  and  $10.3\% [2.5 \text{ to } 18.2]$ , respectively, both  $p = 0.004$ ). Left ventricular end-diastolic and end-systolic volumes were not significantly different among the four groups (data not shown).

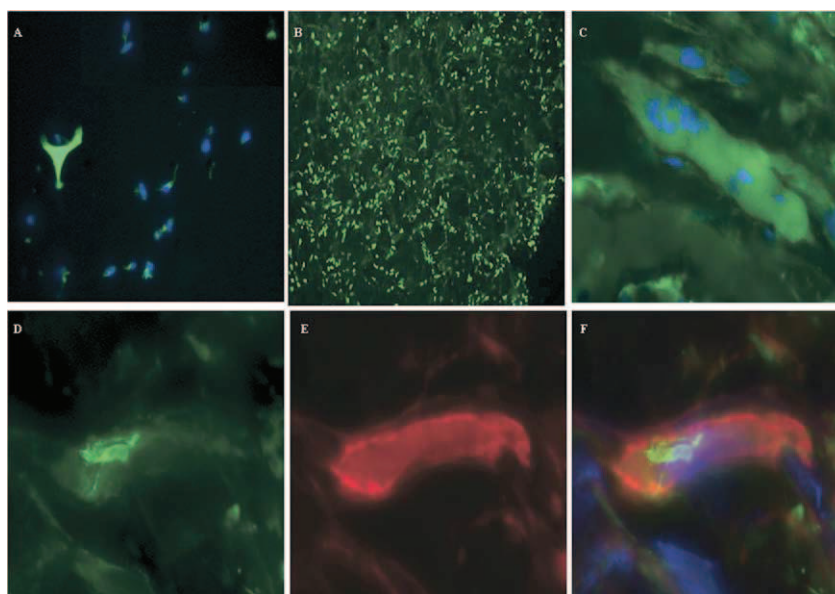
### Cell Engraftment

Seven hearts were processed for quantification of cell engraftment by polymerase chain reaction. Human cells could be detected in two, two, and five of them in the myoblast, cell sheet, and Gelfoam groups, respectively. The DNA concentration (median [min, max]), as determined by qRT-PCR, was  $0.00 \text{ ng}/\mu\text{L} [0.00, 2.60]$ ,  $0.00 \text{ ng}/\mu\text{L} [0.00, 88.00]$ , and  $6.20 \text{ ng}/\mu\text{L} [0.00, 17.40]$  in the myoblast, cell sheet, and Gelfoam groups, respectively ( $p = 0.03$  for Gelfoam versus myoblasts), but we failed to find a significant correlation between the amount of residual DNA in each heart and the corresponding functional outcome. Immunostaining against the fast skeletal muscle marker My32 (Fig 2) showed that in the two scaffold-treated groups, myogenic cells remained confined within the epicardial construct and had not migrated into the infarcted area. In keeping with the polymerase chain reaction data, the presence of these cells was minimal (1+) in the cell sheet group and greater (2+ or 3+) in the Gelfoam group.

### Angiogenesis

There was a greater degree of angiogenesis in the two scaffold-treated groups. Thus, the median (min, max)

Fig 2. Detection of human cells in myoblast-seeded collagen sponge (Gelfoam; Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, MI) before (A) and after (B–F) implantation in infarcted myocardium. (A–C) Immunofluorescence staining shows the presence of desmin-positive cells in the myoblast-seeded collagen sponge 3 weeks after cell culture (A). One month after implantation in infarcted myocardium, immunofluorescence shows the presence of many human cells identified by their positive staining for the human lamin A/C (B, D); some of them express the adult fast myosin heavy-chain marker (My32) and have differentiated into multinucleated myotubes (C). (D–F) Grafted cell expressing the human marker lamin A/C (D) and the myogenic marker My32 (E). Picture F represents the merged image. Nuclei are stained blue by 4', 6-diamidino-2-phenylindole. Bar = 75  $\mu$ m (A); 125  $\mu$ m (B); 25  $\mu$ m (C); 10  $\mu$ m (D–F).



number of vessels per square millimeter was 190 (187, 199), 304 (221, 327), 520 (330, 528), and 426 (397, 448) in the control, myoblast, Gelfoam, and cell sheet groups, respectively (Gelfoam versus controls, nonadjusted  $p = 0.03$ ; cell sheet versus controls, nonadjusted  $p = 0.02$ ).

### Fibrosis

The extent of fibrosis, expressed as a percentage of the infarcted area, featured grossly similar patterns. The median (min, max) percentage was 66% (61%, 73%), 61% (51%, 79%), 36% (34%, 44%), and 43% (28%, 94%) in the control, myoblast, Gelfoam, and cell sheet groups, respectively. Only the difference between the Gelfoam and the control and myoblast groups reached statistical significance (nonadjusted  $p = 0.02$  and  $p = 0.04$ , respectively). Immunostaining against ED1 showed that the infiltration of the two scaffolds and the underlying infarcted area by macrophages was overall moderate and tended to be still more limited in the cell sheet group. The infiltration by CD3 was minimal in the three cell-treated groups, thereby reflecting the efficacy of the immunosuppression regimen.

### Expression of Cytokines

There was no significant difference among groups with regard to the expression of mRNA for VEGF or HGF, as determined by qRT-PCR, or the expression of the tissue levels of the corresponding proteins, as determined by Western blot analyses (data not shown). Likewise, levels of the multiple mediators screened by the cytokine array system as well as those of stroma-derived factor 1 $\alpha$  and placenta growth factor failed to show significant between-group differences.

### Comment

A consistent finding of cell therapy studies is the very low rate of sustained cell engraftment, which can drop as low

as 1% of the initial number of donor cells a few weeks after transplantation [8]. Taking into account that the cardiomyocyte deficit resulting from an infarction large enough to cause heart failure is in the range of 1 billion cells [9], one cannot realistically expect a clinically meaningful benefit from such a tiny number of residual donor cells, particularly in the case of skeletal myoblasts for which a clear dose-effect relationship has been documented [10]. This low rate of engraftment is initially caused by a mechanical leakage of cells [11–13] and subsequently worsened by an interplay of biologic factors that include inflammation, ischemia owing to poor vascularization of the injected areas, and apoptosis subsequent to detachment of anchorage-dependent cells from their extracellular matrix, so-called anoikis [14]. The recognition of these contributing factors provides a rationale for embedding cells into three-dimensional biodegradable scaffolds that might better preserve cell survival and proliferation compared with proteolysis followed by injection of isolated cells. Furthermore, the epicardial delivery of these scaffolds avoids the drawbacks associated with multiple needle-based injections, which include (1) a washout of cells through channel leakage and the vascular system, (2) an inhomogeneous distribution of cells, (3) the disruption of the extracellular matrix and the subsequent loss of signals that modulate cell survival, differentiation, and patterning, (4) the lack of reproducibility, and (5) a potential proarrhythmic risk attributable to the conduction blocks created by the clusters of cells interspersed in the disrupted myocardial tissue [8]. On the basis of these grounds, two conceptually different constructs, cell sheets and collagen scaffolds, were tested in the present study.

Scaffold-free cell sheets can be manufactured onto temperature-sensitive [15] or, like in our experiments, fibrin-coated culture dishes [7]. In both settings, two detached cell sheets can be piled one on top of the other as beyond this number, the thickness of the construct



may prevent adequate oxygenation of the outer layers. The advantages of this approach include (1) the lack of any foreign material, (2) the maintenance of intercellular connections through anchorage of the cells to a self-secreted extracellular matrix, and (3) possibly a mechanical cyclic strain-induced orientation of the layered cells toward a cardiomyogenic phenotype [16]. The main limitation of the cell sheets is their fragility, which complicates manipulations at the time of transplantation. In the present study, the myoblast cell sheet group yielded better results than the conventional injection technique with regard to preservation of LV function, angiogenesis, and to a lesser extent, limitation of fibrosis. These data are consistent with those that have been reported with myoblast cell sheets prepared onto temperature-sensitive dishes, both in ischemic [17] and nonischemic [18] cardiomyopathy models. However, an unexpected observation was that this superior outcome did not correlate with a greater rate of engraftment as there were only very few residual donor cells detectable after 1 month. The reason for this massive graft loss is unclear, but it is noteworthy that, so far, a successful use of cell sheets prepared onto fibrin-coated dishes has only been reported with rat neonatal cardiomyocytes [19]. Of note, in this study, there was evidence for bidirectional electrical communication between the host heart and the cell sheet without inducible arrhythmias by a programmed stimulation protocol, which strengthens the concept that replacement of intramyocardial injections by epicardial cell deposition may increase the safety of stem cell delivery. However, one cannot exclude that myoblast culture on fibrin-coated dishes is less effective than when it is done on temperature-sensitive plates because stem cell–biomaterial interactions have been shown to be cell-specific [20]. Furthermore, whereas myoblasts were cultured for 9 days onto the fibrin-coated dishes, the incubation time with temperature-sensitive dishes is shortened to 1 to 2 days. This temporal difference may also affect the patterning of intercellular connections and the associated anchorage-dependent survival signaling. Indeed, temperature-sensitive dishes look particularly appealing because their surface characteristics seem to accommodate a large variety of cells for the manufacturing of cell sheets.

Collagen-based constructs have already been shown to exert powerful angiogenic effects, regardless of whether collagen was used in a liquid form in conjunction with cells [21] or a cell-free solid scaffold [22]. In the present study, we selected to seed myoblasts onto Gelfoam, a three-dimensional gelatin matrix with a honeycomb-like structure, because this material features excellent handling characteristics and allows adequate cell growth kinetics, as demonstrated by the large increase in the myoblast number within 3 weeks of incubation inside the patch. Previous studies have established that Gelfoam sponges were effective vehicles for delivering mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy [23], endothelial cells for control of vascular repair after arterial injury [24], and cardiomyoblasts for preserving function of heterotopically transplanted hearts [3]. Interest-

ingly, it has also been shown that endothelial cells embedded in Gelfoam were protected from both allogeneic and xenogeneic immune rejection [25], but this property was not tested in this study because the parallel use of human myoblasts (in suspension or layered as cell sheets) required in any event an immunosuppressive therapy. Our data confirm that incorporation of skeletal myoblasts in Gelfoam is an effective means of increasing cell engraftment and correspondingly improved LV function, increased angiogenesis, and reduced fibrosis. Although we did not include a group receiving a cell-free patch, it is unlikely that these beneficial effects could be attributed to the matrix alone as epicardial deposition of an acellular collagen sponge has failed, in a similar model, to provide any benefit [4], probably because this material is too soft to mechanically scaffold the infarct area and prevent its remodeling. Of note, the remaining cells were confined within the patch without evidence for penetration within the myocardium. This may not be such an issue with skeletal myoblasts, which, because of their lineage-restriction, are in any event unable to convert into cardiomyocytes and thus establish electromechanical connections with the host cardiac cells [26]. Previous studies, however, have reported that epicardially delivered rat neonatal cardiomyocytes were able to foster such connections [19], and patch-embedded mesenchymal stem cells have also been shown to invade the underlying infarcted area [2]. Thus, the extent to which the phenotype of the grafted cells along with their migratory capacity from the supporting patch may affect the patterns of scar recolonization remains to be investigated.

Technical factors related to the optimal cell-seeding density for each substrate (collagen sponge or fibrin-coated dish) and to the material-specific growth characteristics of the cells precluded us from matching the ultimate number of myoblasts that were delivered in each group. Clearly, however, this number was smaller in the cell sheet and Gelfoam groups, and the finding that hearts in these two groups yet demonstrated superior outcomes compared with those injected intramyocardially strengthens the conclusion about the efficacy of epicardial cell delivery. Interestingly, although the two construct-treated groups yielded equivalent functional recoveries, they markedly differed with regard to the number of residual cells, which were much more abundant in the Gelfoam-treated hearts than in those covered with the myoblast sheets. Similarly, a cardiac patch made of mesenchymal stem cells embedded in collagen has been shown to improve postinfarction myocardial remodeling despite the lack of detectable cells 4 weeks after patch implantation [4]. Although the xenogeneic setting of the present study may have aggravated graft loss despite immunosuppression, this effect would be expected to have been equally balanced among all groups. The reason for the discrepancy in cell numbers between the two patch groups remains unclear but could be related to the fact that the three-dimensional collagen scaffold onto which myoblasts were incorporated was more conducive to their survival and proliferation than

the thin bilayer cell sheet. Regardless of the causes for this difference in cell numbers, these data support the assumption that transplanted cells do not primarily act by physically replacing dead cardiomyocytes but rather activate host-associated endogenous pathways that subsequently remain operative on their own even though the trigger cells have disappeared. This paracrine mode of action is thought to account for the common discrepancy between the functional benefits of cell transplantation and the scarcity of long-term donor cell engraftment [27]. It is supported by the previous observations that delivery of human endothelial progenitors in nude mice [28] or transplantation of mouse myoblasts in swine [29] results in an upregulation of host-associated cytokines and growth factors. Likewise, human mesenchymal stem cells embedded into a collagen patch epicardially applied onto rat hearts have been shown to increase the number of native recipient-specific myofibroblasts [4]. Recently, additional compelling evidence for the predominant involvement of cell-released mediators has been offered by a study in which the sole injection of the cell-derived conditioned medium was sufficient to trigger cardioprotective effects in a porcine model of myocardial infarction [30]. However, in the present study, our combinatorial approach looking at both mRNA and protein expression (by two different techniques) failed to demonstrate the upregulation of various recipient-specific cytokines, particularly VEGF and HGF. A possible explanation is that these mediators are relatively short-lived, which could have prevented an increase in their tissue levels from being detectable after 1 month whereas the events they have triggered (increased angiogenesis, reduced fibrosis) are still present. Indeed, in the study by Cho and coworkers [28], which has demonstrated the activation of host-associated signaling pathways by engrafted cells, the follow-up was limited to 14 days. Likewise, in experiments showing that the myoblast cell sheet resulted in higher tissue levels of VEGF and HGF than injections of the same myogenic cells, polymerase chain reaction was performed 7 days after transplantation [17]. In line with these findings, in the study in which a mouse myoblast cell line was injected into swine hearts, angiogenesis was found to be significantly higher than in controls after 1 month whereas at the same time, transcripts for porcine VEGF were absent or only minimally expressed [29]. Of note, the present data suggest that the paracrine effects largely documented for mesenchymal stem cells [31–33] are also relevant to skeletal myoblasts, which is in line with the previous observation that epicardially applied myoblast cell sheets release cardioprotective signaling molecules more effectively than when these cells are injected intramyocardially [17]. Altogether, these results are consistent with the report by Ebelt and coworkers [34] and our own findings [35] that myoblasts release a blend of cardioactive growth factors and cytokines favorably modulating cardiomyocyte survival, inflammation, matrix composition, and scar formation.

In conclusion, these data suggest that the benefits of cell transplantation can be potentiated by an epicardial deposition of the cells, as opposed to their usual in-

tramyocardial injection. The advantages of this mode of delivery, which likely extend beyond the sole use of skeletal myoblasts, could make cell therapy both more effective and more user-friendly in that a preshaped cellularized patch made of a clinically usable material can be expeditiously and reproducibly deposited onto the surface of the heart during a surgical open chest procedure.

This research was supported in part by a grant from the LeDucq Foundation (Cardiac Progenitors Transatlantic Alliance network 04 CVD 04).

## References

1. Menasché P. Current status and future prospects for cell transplantation to prevent congestive heart failure. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2008;20:131–7.
2. Derval N, Barandon L, Dufourcq P, et al. Epicardial deposition of endothelial progenitor and mesenchymal stem cells in a coated muscle patch after myocardial infarction in a murine model. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008;34:248–54.
3. Kutschka I, Chen IY, Kofidis T, et al. Collagen matrices enhance survival of transplanted cardiomyoblasts and contribute to functional improvement of ischemic rat hearts. *Circulation* 2006;114(1 Suppl):I-167–73.
4. Simpson D, Liu H, Fan TH, Nerem R, Dudley SC Jr. A tissue engineering approach to progenitor cell delivery results in significant cell engraftment and improved myocardial remodeling. *Stem Cells* 2007;25:2350–7.
5. Zvibel I, Smets F, Soriano H. Anoikis: roadblock to cell transplantation? *Cell Transplant* 2002;11:621–30.
6. Menasché P, Hagege AA, Scorsin M, et al. Clinical myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001;367:279–80.
7. Itabashi Y, Miyoshi S, Kawaguchi H, et al. A new method for manufacturing cardiac cell sheets using fibrin-coated dishes and its electrophysiological studies by optical mapping. *Artif Organs* 2005;29:95–103.
8. Fukushima S, Varela-Carver A, Coppen SR, et al. Direct intramyocardial but not intracoronary injection of bone marrow cells induces ventricular arrhythmias in a rat chronic ischemic heart failure model. *Circulation* 2007;115:2254–61.
9. Murry CE, Reinecke H, Pabon LM. Regeneration gaps. Observations on stem cells and cardiac repair. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:1777–85.
10. Tambara K, Sakakibara Y, Sakaguchi G, et al. Transplanted skeletal myoblasts can fully replace the infarcted myocardium when they survive in the host in large numbers. *Circulation* 2003;108(Suppl 1):II-259–63.
11. Dow J, Simkhovich BZ, Kedes L, Kloner RA. Washout of transplanted cells from the heart: a potential new hurdle for cell transplantation therapy. *Cardiovasc Res* 2005;67:301–7.
12. Zhang H, Song P, Tang Y, et al. Injection of bone marrow mesenchymal stem cells in the borderline area of infarcted myocardium: heart status and cell distribution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;134:1234–40.
13. Hudson W, Collins MC, deFreitas D, Sun YS, Muller-Borer B, Kypson AP. Beating and arrested intramyocardial injections are associated with significant mechanical loss: implications for cardiac cell transplantation. *J Surg Res* 2007;142:263–7.
14. Smets FN, Chen Y, Wang LJ, Soriano HE. Loss of cell anchorage triggers apoptosis (anoikis) in primary mouse hepatocytes. *Mol Genet Metab* 2002;75:344–52.
15. Yang J, Yamato M, Nishida K, et al. Cell delivery in regenerative medicine: the cell sheet engineering approach. *J Control Release* 2006;116:193–203.

16. Gwak SJ, Bhang SH, Kim IK, et al. The effect of cyclic strain on embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Biomaterials* 2008;29:844–56.
17. Memon IA, Sawa Y, Fukushima N, et al. Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130:1333–41.
18. Kondoh H, Sawa Y, Miyagawa S, et al. Longer preservation of cardiac performance by sheet-shaped myoblast implantation in dilated cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc Res* 2006;69:466–75.
19. Furuta A, Miyoshi S, Itabashi Y, et al. Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, in vivo. *Circ Res* 2006;98:705–12.
20. Neuss S, Apel C, Buttler P, et al. Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering. *Biomaterials* 2008;29:302–13.
21. Suuronen EJ, Veinot JP, Wong S, et al. Tissue-engineered injectable collagen-based matrices for improved cell delivery and vascularization of ischemic tissue using CD133+ progenitors expanded from the peripheral blood. *Circulation* 2006;114(1 Suppl):I-138–44.
22. Callegari A, Bollini S, Iop L, et al. Neovascularization induced by porous collagen scaffold implanted on intact and cryoinjured rat hearts. *Biomaterials* 2007;28:5449–61.
23. Ponticelli MS, Schinagl RM, Kadiyala S, Barry FP. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *J Biomed Mater Res* 2000;52:246–55.
24. Nugent HM, Edelman ER. Endothelial implants provide long-term control of vascular repair in a porcine model of arterial injury. *J Surg Res* 2001;99:228–34.
25. Methe H, Groothuis A, Sayegh MH, Edelman ER. Matrix adherence of endothelial cells attenuates immune reactivity: induction of hyporesponsiveness in allo- and xenogeneic models. *FASEB J* 2007;21:1515–26.
26. Leobon B, Garcin J, Menasché P, Vilquin JT, Audinat E, Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7808–11.
27. Iso Y, Spees JL, Serrano C, et al. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:700–6.
28. Cho HJ, Choi YJ, Lee Y, Curry C, Yoon YS. Role of host tissues for sustained humoral effects following progenitor cell transplantation into the ischemic heart [Abstract]. *Circulation* 2007;116(Suppl):II-103.
29. Formigli L, Perna AM, Meacci E, et al. Paracrine effects of transplanted myoblasts and relaxin on post-infarction heart remodelling. *J Cell Mol Med* 2007;11:1087–100.
30. Timmers L, Lim SK, Arslan F, et al. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Res* 2008;1:129–37.
31. Gneccchi M, He H, Liang OD, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 2005;11:367–8.
32. Tang YL, Zhao Q, Qin X, et al. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Ann Thorac Surg* 2005;80:229–36.
33. Uemura R, Xu M, Ahmad N, Ashraf M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res* 2006;98:1414–21.
34. Ebelt H, Jungblut M, Zhang Y, et al. Cellular cardiomyoplasty: improvement of left ventricular function correlates with the release of cardioactive cytokines. *Stem Cells* 2007;25:236–44.
35. Perez-Ilzarbe M, Agbulut O, Pelacho B, et al. Characterization of the paracrine effects of human skeletal myoblasts transplanted in infarcted myocardium. *Eur J Heart Fail* 2008;10:1065–72.

## INVITED COMMENTARY

In recent years, stem cell therapy has received considerable attention as a novel therapeutic option for refractory congestive heart failure. Although the mechanisms through which these cells elicit functional improvement are yet to be fully determined, recent studies suggest that paracrine effects, rather than direct trans-differentiation of donor cells into cardiomyocytes, may predominate in augmenting postinfarction cardiac function.

Progress in cell therapy, however, is hampered by suboptimal engraftment of donor cells into the myocardium, related to the extensive cell death that ensues from the hostile milieu into which the donor cells are introduced. This problem has stimulated further investigation of the use of bioengineered scaffolds as cell delivery vehicles, with the hope that these constructs may enhance cell retention and functional recovery.

In this study, Hamdi and colleagues [1] evaluated the effect of differing cell delivery techniques on postinfarct heart function. Using skeletal myoblasts as donor cells in a rat infarct model, the authors compared the conventional intramyocardial injection technique with epicardial placement of two cell-seeded constructs, one made of a double-layered myoblast cell sheet and the other constructed from a cell-seeded Gelfoam (Pharmacia & Upjohn/Pfizer, New York, NY) patch. The authors concluded that the two epicardially delivered tissue scaffolds

led to significant improvements in left ventricular ejection fraction (LVEF) compared with the controls injected with culture medium, whereas intramyocardial injection prevented further deterioration of ventricular function but did not improve LVEF. Histologic analysis also showed greater angiogenesis in the two epicardially treated groups.

The major quandary posed by these findings is that the effects of the varying techniques of cell transfer were unrelated to the detectable persistence of the myoblasts at the studied time point. Analysis of cell engraftment revealed minimal donor cell retention, with residual human cells detected in only 2 of 7 hearts in each of the two groups treated with the epicardial scaffold. The authors attribute the between-group differences in LVEF to donor cell effects at earlier, unevaluated time points (ie, earlier than 1 month). Their analysis of cytokines 1 month after cell delivery showed no differences between groups that might explain differences in functional recovery, but this, like the absence of persistent donor cells, may merely be a reflection of the time point chosen.

Somewhat surprisingly, end-systolic and end-diastolic volumes did not differ between groups. Thus, although the cell sheets and Gelfoam patch improved LVEF, they did not do so by reducing infarct expansion compared with intramyocardial injection. Ultimately, the lack of a

## Cell Delivery: Intramyocardial Injections or Epicardial Deposition? A Head-to-Head Comparison

Hadhami Hamdi, Akira Furuta, Valérie Bellamy, Alain Bel, Etienne Puymirat, Séverine Peyrard, Onnik Agbulut and Philippe Menasché

*Ann Thorac Surg* 2009;87:1196-1203

DOI: 10.1016/j.athoracsur.2008.12.074

<b>Updated Information &amp; Services</b>	including high-resolution figures, can be found at: <a href="http://ats.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/87/4/1196">http://ats.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/87/4/1196</a>
<b>References</b>	This article cites 35 articles, 15 of which you can access for free at: <a href="http://ats.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/87/4/1196#BIBL">http://ats.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/87/4/1196#BIBL</a>
<b>Citations</b>	This article has been cited by 1 HighWire-hosted articles: <a href="http://ats.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/87/4/1196#otherarticles">http://ats.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/87/4/1196#otherarticles</a>
<b>Subspecialty Collections</b>	This article, along with others on similar topics, appears in the following collection(s): <b>Molecular biology</b> <a href="http://ats.ctsnetjournals.org/cgi/collection/molecular_biology">http://ats.ctsnetjournals.org/cgi/collection/molecular_biology</a>
<b>Permissions &amp; Licensing</b>	Requests about reproducing this article in parts (figures, tables) or in its entirety should be submitted to: <a href="http://www.us.elsevierhealth.com/Licensing/permissions.jsp">http://www.us.elsevierhealth.com/Licensing/permissions.jsp</a> or email: <a href="mailto:healthpermissions@elsevier.com">healthpermissions@elsevier.com</a> .
<b>Reprints</b>	For information about ordering reprints, please email: <a href="mailto:reprints@elsevier.com">reprints@elsevier.com</a>



# THE ANNALS OF THORACIC SURGERY





# Epicardial adipose stem cell sheets results in greater post-infarction survival than intramyocardial injections

Hadhami Hamdi<sup>1</sup>, Valérie Planat-Benard<sup>2</sup>, Alain Bel<sup>1,3</sup>, Etienne Puymirat<sup>1,4</sup>, Raghd Geha<sup>1,4</sup>, Laetitia Pidial<sup>1</sup>, Hany Nematalla<sup>1,4</sup>, Valérie Bellamy<sup>1</sup>, Philippe Bouaziz<sup>5</sup>, Séverine Peyrard<sup>6</sup>, Louis Casteilla<sup>2</sup>, Patrick Bruneval<sup>7</sup>, Albert A. Hagège<sup>1,4</sup>, Onnik Agbulut<sup>5\*†</sup>, and Philippe Menasché<sup>1,3\*†</sup>

<sup>1</sup>INSERM U633, Laboratory of Biosurgical Research, Paris, France; <sup>2</sup>UPS, CNRS, UMR 5241 Métabolisme, Plasticité et Mitochondrie, University of Toulouse, Toulouse, France; <sup>3</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of Cardiovascular Surgery; University Paris Descartes, Paris, France; <sup>4</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of Cardiology; University Paris Descartes, Paris, France; <sup>5</sup>Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Unit of Functional and Adaptive Biology, CNRS EAC4413, Paris, France; <sup>6</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Epidemiology and Clinical Research Unit; INSERM CIE4, Paris, France; and <sup>7</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of Pathology; University Paris Descartes, Paris, France

Received 23 November 2010; revised 21 March 2011; accepted 4 April 2011

Time for primary review: 27 days

<b>Aims</b>	Intramyocardial injections of cells can damage tissue and enhance dissociation-induced cell death. We assessed whether epicardial delivery of cell sheets could overcome these issues in a rat model of chronic myocardial infarction.
<b>Methods and results</b>	Eighty-two rats that had undergone coronary ligation and simultaneous harvest of fat tissue to yield the adipose-derived stromal cell (ADSC) fraction were randomized 1 month after infarction to receive injections of either control medium ( $n = 24$ ) or $10 \times 10^6$ autologous ADSC ( $n = 37$ ) or the epicardial deposit, onto the infarcted area, of a trilayered ADSC sheet ( $10 \times 10^6$ , $n = 21$ ) prepared by culturing cells on temperature-sensitive dishes. Some treated rats received green fluorescent protein labelled ADSC. Survival, function, and cell engraftment were blindly assessed after 2 months. Prior to implantation, cell sheets and suspended cells were assessed for the expression of extracellular matrix constituents and molecules involved in angiogenesis and cardiac remodelling. The survival rate of rats receiving the cell sheets was significantly higher than after cell injections (73 vs. 41%, $P = 0.01$ ). This correlated with the absence of left ventricular (LV) remodelling in the cell sheet group, as end-diastolic volume only increased by 2.8% compared with baseline [95% confidence interval (CI): $-18.7\%$ ; $+30.0\%$ , $P = 0.81$ ] vs. increases of 25.9% ( $-0.4\%$ ; $+59.2\%$ , $P = 0.05$ ) and 51.2% ( $+18.6\%$ ; $+92.8\%$ , $P = 0.001$ ) in the cell and medium injection groups, respectively. Sheets also resulted in a greater cell engraftment possibly related to the greater expression of extracellular matrix constituents.
<b>Conclusion</b>	The better preservation of LV geometry afforded by ADSC sheets is associated with increased survival and engraftment, which supports the concept of an epicardial delivery of cell-seeded biomaterials.
<b>Keywords</b>	Adipose-derived stromal cells • Transplantation • Chronic ischaemic heart failure • Cell sheet • Extracellular matrix • Temperature-responsive surface

\* Corresponding authors. Tel: +33 1 5609 3622, fax: +33 1 5609 3261, Email: philippe.menasche@egp.aphp.fr (P.M.); Tel: +33 1 5727 7966; fax: +33 1 5727 7966, E-mail: onnik.agbulut@univ-paris-diderot.fr (O.A.)

† These authors contributed equally to this work.

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2011. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.

# 1. Introduction

The efficacy of cardiac cell therapy is still hampered by the high rate of cell death occurring over the first days after transplantation. In a previous head-to-head comparative study,<sup>1</sup> we have shown that the epicardial delivery of a cellularized biomaterial (either a myoblast-seeded collagen patch or a sheet of myoblasts generated by culturing cells onto temperature-responsive dishes) resulted in better outcomes than conventional hand-held transepical injections. This result, which was in keeping with those previously reported by the Japanese group which has pioneered this technology,<sup>2–4</sup> was attributed to the generation, during the culture period, of an extracellular matrix preserving cell cohesiveness and thereby reducing the component of apoptotic death related to their pre-injection proteolytic dissociation.<sup>5,6</sup> So far, however, this mechanistic assumption has been supported by few data. The present two-step study was therefore designed (i) to characterize, *in vitro*, the composition of cell sheets with regard to the presence of extracellular matrix constituents, and then (ii) to compare in an *in vivo* rat model of myocardial infarction, cells sheets, and intramyocardial injections, with survival as the primary endpoint. The reason for this choice is that most, if not all, experimental studies have reported that cells, regardless of their phenotype, improved left ventricular (LV) function, a finding in sharp contrast with the still rather marginal benefits of this therapy in patients. It was thus reasoned that survival would be a more sensitive, more robust and equally relevant marker of treatment effects. Adipose-derived stromal cells (ADSC) were selected as the candidate cells because (i) they can be harvested and grown in a straightforward fashion, and (ii) they secrete a wide array of angiogenic and anti-apoptotic factors<sup>7,8</sup> that likely account for their beneficial effects on perfusion and function in both small<sup>9,10</sup> and large<sup>11</sup> animal models of myocardial infarction.

# 2. Methods

## 2.1 Animals

Eighty-two female Wistar rats (Janvier) weighing an average of 200–250 g were used in this study. All procedures were approved by our institutional Ethics Committee and complied with the European legislation (European Commission Directive 86/609/EEC) on animal care.

## 2.2 Myocardial infarction model and transplantation

Permanent ligation of the left anterior descending coronary artery was performed as described previously.<sup>1</sup> Briefly, rats were anaesthetized with isoflurane (Baxter, Maurepas, France), 3% at induction and 2% for maintenance and tracheally ventilated at a rate of 70/min and with an 0.2 mL average insufflate volume (Alphalab, Minerve, Esternay, France). Analgesia was performed for 2 days after surgery with a 10 mg/kg subcutaneous injection of ketoprofen (Merial, Lyon, France). The heart was exposed through a left thoracotomy, and the left coronary artery was permanently ligated between the pulmonary artery trunk and the left atrial appendage. One month after myocardial infarction, rats underwent a baseline echocardiographic assessment of LV function. Following a median sternotomy, animals were then randomly allocated to receive three in-scar injections of phosphate-buffered saline (PBS) (controls,  $n = 24$ ) or autologous ADSC ( $10 \times 10^6$ ,  $n = 37$ ) or underwent the epicardial deposition of a triple-layer autologous ADSC sheet ( $10 \times 10^6$  cells,  $n = 21$ ) overlaying the infarcted area. Several volumes were used in the ADSC injection group: 80, 100, and 150  $\mu$ L. Intramyocardial

injections were performed with a 29-gauge needle, while the autologous ADSC sheets spontaneously adhered to the surface of the heart. Two months after treatment, all animals underwent a repeat echocardiographic assessment of LV function and were euthanized with an overdose of isoflurane. All rats were treated with cyclosporin A (10 mg/kg/d, ip, Novartis) 1 day before transplantation and daily until sacrifice. Although cells were of autologous origin, this immunosuppression regimen was deemed necessary because some cells were transduced with enhanced green fluorescent protein (eGFP) (see below), which is known for triggering immune reactions involving the bystander activation of autoreactive T cells by viral-induced inflammatory cytokines.<sup>12</sup>

## 2.3 Assessment of LV function

Pre- and post-transplantation cardiac function was evaluated before transplantation and 2 months thereafter by transthoracic echocardiography (Sequoia 516, equipped with a 13 MHz phased-array linear 15L8 probe, Siemens®) in animals sedated with 2% isoflurane. Parasternal two-dimensional long-axis views allowed to measure LV end-diastolic surface, LV end-systolic surface, LV end-diastolic length, and LV end-systolic length and LV volumes were calculated as  $(8/3\pi) \times (\text{area}^2 / \text{length})$ . Ejection fraction (%) was calculated as  $(\text{LVEDV} - \text{LVESV}) \times 100 / \text{LVEDV}$ . All measurements were made on digital loops in triplicate and averaged by an investigator blinded to the treatment group.

## 2.4 Isolation of ADSC and preparation of cell sheets

Autologous cells from the stromal vascular fraction were isolated from inguinal subcutaneous adipose tissue at the time of myocardial infarction in each rat.<sup>11</sup> After enzymatic digestion and filtration, mature adipocytes were separated from the stromal fraction by centrifugation. The pellet was re-suspended, and cells were seeded in DMEM-F12 medium supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) and maintained in 5% CO<sub>2</sub> till the sub-confluence. Sub-confluent ADSC were obtained after 6 days.<sup>13</sup> ADSC were transduced with a third-generation lentivirus vector expressing eGFP cDNA (BiVIC Vectorology Platform, IFR150, Toulouse) using a MOI of 50 in the presence of protamine sulphate (4  $\mu$ g/mL, Sigma). More than 30% of ADSC were eGFP-positive, as determined by flow cytometry.

Cell sheets were formed by plating of  $3.6 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> ADSC onto thermo-responsive dishes (UpCell™) and kept in a 37°C incubator for 24 h (ADSC-Sheet-24 h) for transplantation studies and for 24 and 48 h (ADSC-Sheet-24 h, ADSC-Sheet-48 h) for *in vitro* characterization studies. Cell sheets detached spontaneously at room temperature within 30 min, and were then washed once with PBS, thereby yielding a scaffold-free monolayered ADSC graft. Three cell sheets were stacked one above the other to yield the triple-layer construct, which was used in transplantation experiments.

## 2.5 Characterization of ADSC sheets

### 2.5.1 Histological examination

ADSC sheets were fixed in 4% formalin overnight and embedded in paraffin. Sections with 5  $\mu$ m thickness were stained with haematoxylin and eosin for visualization of general morphology. Images were taken with an inverted microscope (Leica DMIL) equipped with a digital camera (Qicam, Qimaging).

### 2.5.2 Colony-forming unit formation and differentiation assays

ADSC were cultured on either classic TPP® flasks (ADSC) or seeded for 24 h onto temperature-responsive dishes (ADSC-Sheet-24 h). All cell cultures were then trypsinized and cells collected for further use. For colony-forming unit (CFU)-f assays, the cells were plated at 400 cells per 25 cm<sup>2</sup> flask in DMEM-F12 supplemented with 10% of newborn calf serum. After 14 days of culture, the cells were fixed with methanol and stained with

May–Grünwald–Giemsa (Sigma). The number of colonies were counted and recorded. For differentiation assays, the cells were plated at a density of  $1.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. Adipogenic differentiation was induced at confluence in DMEM-F12 supplemented with 10% FBS, 1  $\mu$ M dexamethasone, 0.5 mM isobutyl-methylxanthine, and 60  $\mu$ M indomethacin for 3 days, and isobutyl-methylxanthine was then removed for the next 18 days. Medium was changed every 2–3 days. The acquisition of the adipogenic phenotype is characterized by cells that contain lipid vesicles and was determined by staining the monolayers with 0.5% Oil Red-O solution. Osteogenic differentiation was induced 1 day after plating in DMEM-F12 supplemented with 10% FBS, 0.1  $\mu$ M dexamethasone, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 50  $\mu$ g/mL ascorbic acid for 21 days. Medium was changed every 2–3 days. Osteogenic mineralization was assessed by staining with 40 mM Alizarin red (pH 4.1, Sigma).

### 2.5.3 RT<sup>2</sup> Profiler PCR array and qRT–PCR

This array is a pathway-focused gene expression profiling using real-time PCR. The system allows one to identify genes involved in the extracellular matrix constitution, cell adhesion, and remodelling. RNA was isolated using RNeasy Mini kit (Qiagen). The single strand cDNA from 1  $\mu$ g total RNA was synthesized using RT<sup>2</sup> First Strand Kit (SABioscience). Real-time PCR was performed according to the user manual of RT<sup>2</sup> Profiler PCR array system (SABioscience) using SYBR Green PCR Master Mix in a Light Cycler 480 system (Roche Diagnostics). Rat extracellular matrix and adhesion molecules PCR array (SABioscience) were repeated three times for each condition and data were analysed using Excel-based PCR Array Data Analysis Templates (SABioscience). In addition, qRT–PCR was used to quantify transcripts for rat-specific hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1 $\alpha$ ), vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1), and cyclin D1. The messenger RNA expression levels of target genes were normalized to hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase signals as housekeeping gene, and all experiments were performed in triplicate.

### 2.5.4 Western blot analysis

ADSC and ADSC-Sheet-24 h lysates (40  $\mu$ g/lane) were separated by sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis before electrophoretic transfer onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Western blot analysis was carried out using anti-metalloprotease tissue inhibitor type 1 (Timp1, 1:500, rabbit polyclonal, Santa Cruz Technology), anti-integrin alpha 2 (Itag2, 1:500, mouse monoclonal, Santa Cruz Technology), anti-elastin microfibril interfacer 1 (Emilin1, 1:500, rabbit polyclonal, Santa Cruz Technology), anti-phospho-Akt 1/2/3 (Ser 473) (1:1000, rabbit polyclonal, Santa Cruz Technology), and anti-pan actin (Clone C4, 1:20000, mouse monoclonal, Millipore) antibodies. Antibody-reacting bands were visualized after development with peroxidase-conjugated secondary antibodies (Pierce Biotechnology) and a chemiluminescent detection system (ECL-Plus; GE Healthcare). Bands were quantified by densitometric software (Scion Image, NIH).

## 2.6 Tissue processing, histological, and immunohistochemical assessment

After the last echocardiographic assessment and sacrifice, hearts were removed and separated in two halves by a short-axis section through the mid-portion of the infarcted area. The blocks were immediately fixed in Tissue-Tek (Sakura) and frozen in liquid-nitrogen-cooled isopentane until they were sliced into 7  $\mu$ m thick cryosections using an ultramicrotome (Leica). Haematoxylin and eosin staining was used to delineate the area of myocardial infarction. The presence of grafted cells was detected by immunofluorescence using an antibody directed against GFP (1:800, rabbit polyclonal, Invitrogen). Engraftment was then assessed by a semi-quantitative score ranging from 0 (no cells), 1 (minimal amount

of cells), 2 (moderate amount of cells) to 3 (large amount of cells). ADSC cells were also identified using antibodies directed against CD90 (1:200, mouse monoclonal, BD Biosciences) and CD73 (1:200, mouse monoclonal, BD Biosciences). In addition, immunolabelling was performed with antibodies directed against alpha-actinin (1:50, mouse monoclonal, Sigma-Aldrich), a rat-specific endothelial cell antibody (RECA, clone HIS52, 1:30, mouse monoclonal, Serotec), CD68 (Clone ED-1, 1:100, mouse monoclonal, Serotec), and c-kit (1:50, mouse monoclonal, Dako). Binding of primary antibodies was detected by incubating the sections with FITC- or Texas-red-conjugated anti-mouse IgG (1:40, Vector) or anti-rabbit IgG (1:40, Vector) antibodies. Fibrosis was assessed by Sirius red staining. For each heart, 18 fields spanning the entire infarct area were analysed with a microscope (Leica DMIL) equipped with a digital camera (Qicam, Qimaging).

## 2.7 Statistical analysis

The changes in LV function parameters [LV ejection fraction (LVEF), LV end-diastolic volume (LVEDV), and LV end-systolic volume (LVESV)] were compared between treatment groups using a parametric analysis of variance with time (pre- and post-transplantation), treatment group, and their interaction, and are expressed as ratios of geometric means with their 95% confidence intervals. Comparison of survival in the different groups of animals was analysed by a log-rank test with the Kaplan–Meier method. Statistical significance was set at the 5% threshold, and all statistical analyses were performed with the SAS statistical software version 9.1 (Cary, NC 27513, USA).

The post-transplantation percentages of fibrosis were analysed using a parametric analysis of covariance with the treatment group and the pre-transplantation LVEF as covariates. The numbers of vessels per mm<sup>2</sup> were compared between groups using a mixed model for clustered continuous data, taking into account the intra-heart correlation (as multiple slices were used for a single heart), and including the treatment group and the pre-transplantation LVEF as covariates. A square root transformation of the numbers of vessels was done to satisfy hypotheses required for the parametric model and confidence intervals were estimated by the delta method.

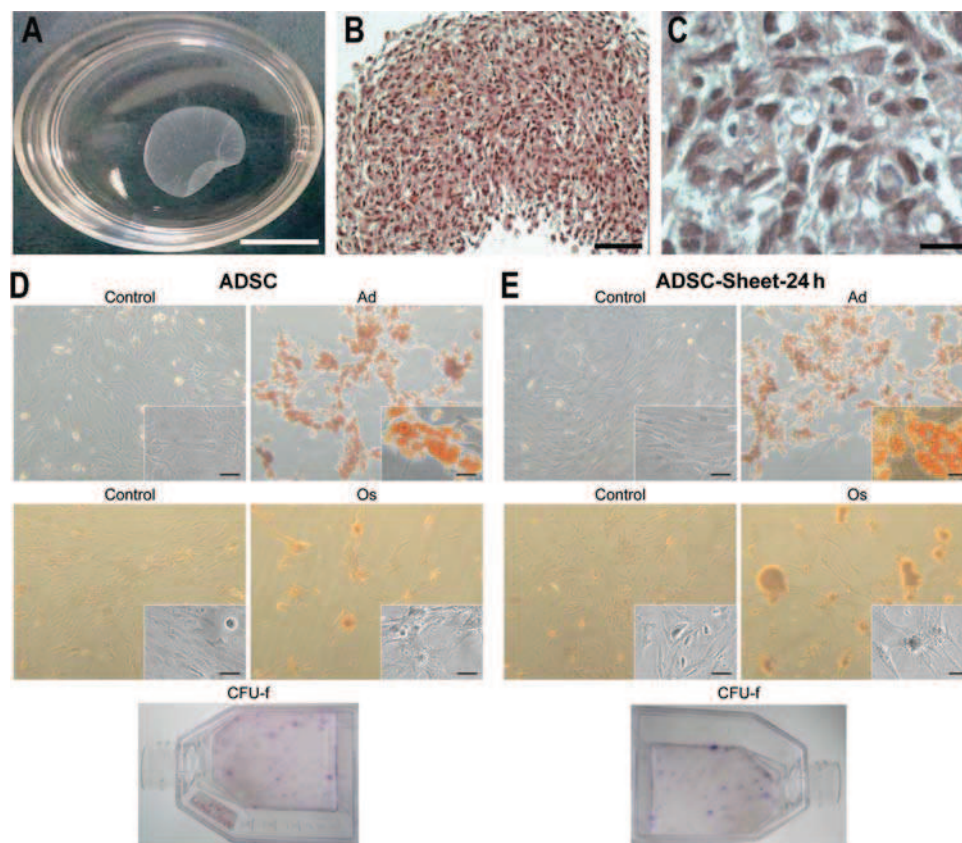
## 3. Results

### 3.1 Characterization of the ADSC sheet

ADSC sheets were detached spontaneously at room temperature, thereby yielding a scaffold-free monolayered ADSC graft (Figure 1A). These sheets feature a ‘carpet’ of cells well connected with each other, and cell morphology was not modified following 24 h on the temperature-responsive surface (Figure 1B and C). ADSC properties were not affected either, as cells cultured for 24 h on temperature-responsive surfaces maintained their capacity to form CFU-f and to differentiate along the adipogenic and osteogenic lineages (Figure 1D and E).

In order to identify extracellular matrix proteins and/or cell adhesion molecules implicated into the formation of cell sheets, we used the quantitative RT<sup>2</sup> Profiler<sup>TM</sup> PCR array, which revealed that there was no significant difference in the gene expression profile, regardless of whether cells (at the same density of  $3.6 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) were cultured onto classical or temperature-sensitive surfaces, for 24 or 48 h (Figure 2A). However, comparison of PCR results between ADSC-Sheet-24 h and suspended ADSC showed that five genes were significantly up-regulated (fold changes): Itag2 (3.02,  $P = 0.013$ ), Emilin1 (2.54,  $P = 0.010$ ), Timp1 (1.79,  $P = 0.019$ ), Cspg2 (1.67,  $P = 0.044$ ), and extracellular matrix protein 1 (1.66,  $P = 0.012$ ) (Figure 2B). To confirm the validity of these genomic





**Figure 1** *In vitro* characterization of ADSC sheets. ADSC sheets detached spontaneously at room temperature after a 24 h culture onto temperature-responsive surfaces, thereby yielding a scaffold-free monolayered ADSC graft (A). Haematoxylin–eosin staining shows that the cell sheet represents a carpet of cells well interconnected with each other (B and C). Differentiation assays and CFU-f in ADSC (D) and ADSC-Sheet-24 h (E). For these assays, ADSC were cultured onto classic or temperature-responsive surfaces during 24 h, and assays were performed after trypsinization of these cells. Adipogenic (Ad) and osteogenic differentiation (Os) of ADSC is characterized by Oil-Red-O and Alizarin red staining, respectively. Bar: 10 mm (A), 30  $\mu$ m (B), 12  $\mu$ m (C), and 50  $\mu$ m (D–E).

data, we selected the significantly up-regulated genes to further study their changes in expression by real-time PCR (data not shown) and western blot (Figure 2C). Our results confirmed that Emilin1, Itag2, and Timp1 proteins were up-regulated in ADSC-Sheet-24 h compared with suspended ADSC. Prior to implantation, cell sheets and suspended cells were also assessed for the expression of a cell survival signalling mediator (Akt phosphorylation) (Figure 2C) and for some of the key molecules involved in angiogenesis (HIF1 $\alpha$ , VEGF-A, and VEGFR-1) and in adaptative cardiac remodelling (TGF- $\beta$ 1, IGF-1). Our results demonstrated that all these factors were up-regulated in ADSC-Sheet-24 h compared with suspended ADSC (data not shown).

### 3.2 Survival

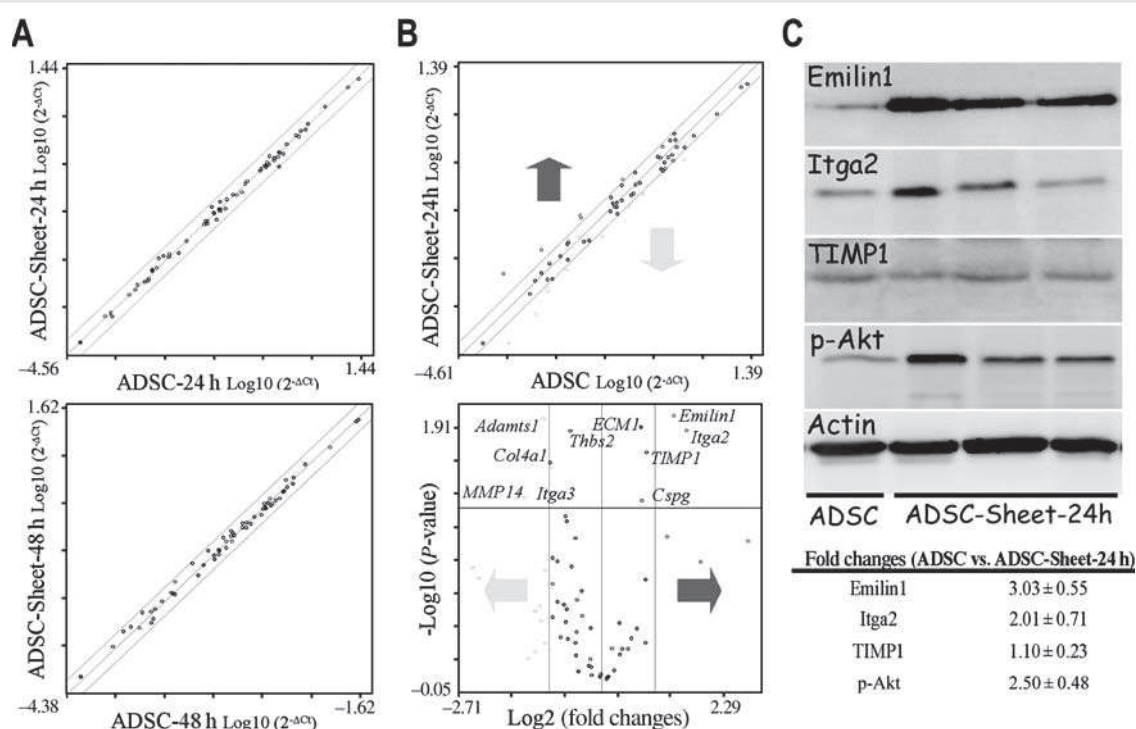
There was a significant difference ( $P < 0.02$  by the log-rank test) in survival between the three groups, the highest rate being yielded by the cell sheet group (Figure 3A). Of note, whereas pair-wise comparisons failed to detect a significant difference in the survival rate between control and cell-injected rats ( $P = 0.09$ ), they showed that the cell sheet group had a significantly higher survival compared with the cell-injected rats ( $P = 0.01$ ). Most of the deaths occurred over the first 3 weeks after the procedure, after which survival

curves tended to level off and became parallel between groups. Reducing the volume of injection (from 150 to 100  $\mu$ L and further down to 80  $\mu$ L) failed to significantly alter the mortality rate in the cell-treated group ( $P = 0.68$  by the log-rank test). Likewise, mortality adjusted for delivered volume was still not significantly different between medium- and cell-injected hearts (Figure 3B).

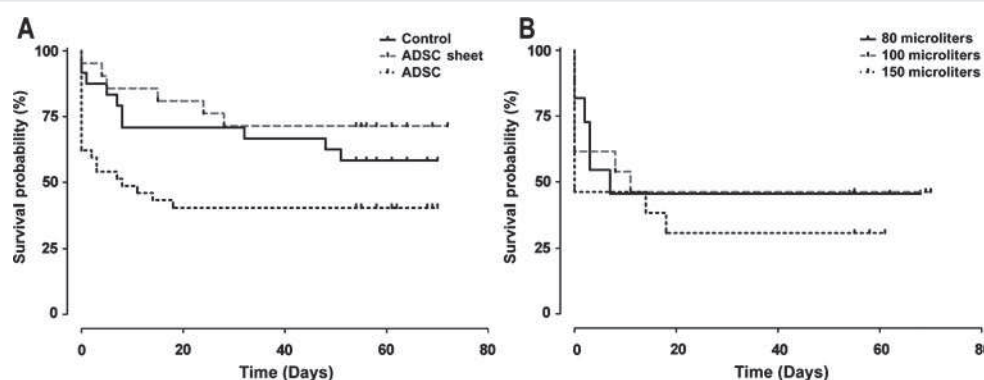
### 3.3 LV function

Baseline functional parameters did not differ significantly between the three groups (Table 1). After exclusion of deaths that occurred during the follow-up period, 14, 15, and 15 animals in the control, ADSC injection group, and ADSC cell sheet group, respectively, remained available for the 2-month functional outcome analysis. Prevention of LV remodelling was observed in the cell sheet group where LVEDV was virtually unchanged [ $+2.8\%$  (95% confidence interval (CI):  $-18.7\%$ ;  $+30.0\%$ ) compared with baseline;  $P = 0.81$ ], whereas it increased by  $25.9\%$  (95% CI:  $-0.4\%$ ;  $59.2\%$ ) in the cell injection group ( $P = 0.05$ ) and by  $51.2\%$  (95% CI:  $18.6\%$ ;  $92.8\%$ ) in the placebo medium-injected control group ( $P = 0.001$ ). These conclusions were further supported by between-group pair-wise comparisons of changes in LVEDV over time (i.e. post- vs. pre-transplantation values). Thus, comparison of changes between





**Figure 2** Extracellular matrix composition of ADSC sheets. Changes in extracellular matrix and adhesion molecule gene profiles of ADSC cells cultured during 24 h (A, upper panel) or 48 h (A, lower panel) at the same density ( $3.6 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) onto classic (ADSC-24 h, ADSC-48 h) or temperature-responsive surfaces (ADSC-Sheet-24 h, ADSC-Sheet-48 h). Note that the culture surface does not influence the extracellular matrix and adhesion molecule gene profile expression. Comparison of gene expression profiles between suspended ADSC and ADSC sheets (ADSC-Sheet-24 h) showing up- and down-regulation of five genes (B). Corresponding changes in protein expression level in ADSC and ADSC-Sheet-24 h (C). Note the up-regulation of Emilin1, Itga2, TIMP1, and phospho-Akt (Ser 473). Data are expressed as mean  $\pm$  SD,  $n = 4$ .



**Figure 3** Kaplan–Meier survival curves after 2-month follow-up. (A) Percentages of surviving animals, in control ( $n = 14$  out of 24), cell-injected ( $n = 15$  out of 37), and cell-sheet-treated ( $n = 15$  out of 21) groups. Note that rats receiving the cell sheet had a significantly higher survival compared with the cell-injected rats ( $P = 0.01$ ). (B) Percentages of surviving animals in cell-injected rats treated with 80  $\mu$ L ( $n = 5$  out of 11), 100  $\mu$ L ( $n = 6$  out of 13), and 150  $\mu$ L ( $n = 4$  out of 13). No significant difference was observed in the survival rate between the animals treated with these different volumes of injection ( $P = 0.68$ ). Significance was analysed with the log-rank test.

the cell-sheet-treated and control rats yielded a negative value [mean:  $-32\%$  (95% CI:  $-51.5\%$ ;  $-4.7\%$ ,  $P = 0.02$ )] confirming the lesser degree of remodelling in the former group. A similar conclusion was drawn from the comparison of changes in LVEDV between the cell sheet and cell injection groups [ $-18.3\%$  (95% CI:  $-41.4\%$ ;

$+13.8\%$ ]]. Analysis of changes in LVESV showed similar patterns with a mean of  $0.7\%$  (95% CI:  $-26.7\%$ ;  $+34.6\%$ ) decrease compared with baseline values in the cell sheet group ( $P = 0.96$ ) vs. increases of  $34.0\%$  (95% CI:  $-1.2\%$ ;  $81.6\%$ ,  $P = 0.05$ ) and  $110.4\%$  (95% CI:  $53.6\%$ ;  $188.2\%$ ,  $P < 0.0001$ ) in the cell injection and control groups,

**Table 1** Summary of functional results

Group	n	LVEDV (mL)		LVESV (mL)		LVEF (%)	
		Baseline	Post-Tx	Baseline	Post-Tx	Baseline	Post-Tx
Control	14	0.33 ± 0.09	0.52 ± 0.22*	0.16 ± 0.05	0.37 ± 0.21**	53.0 ± 6.1	32.5 ± 13.3**
ADSC	15	0.33 ± 0.09	0.41 ± 0.10 <sup>†</sup>	0.18 ± 0.07	0.24 ± 0.08 <sup>†</sup>	45.6 ± 9.4	42.3 ± 9.2
ADSC-Sheet	15	0.39 ± 0.12	0.40 ± 0.13	0.22 ± 0.10	0.22 ± 0.09	43.9 ± 7.6	45.5 ± 9.2

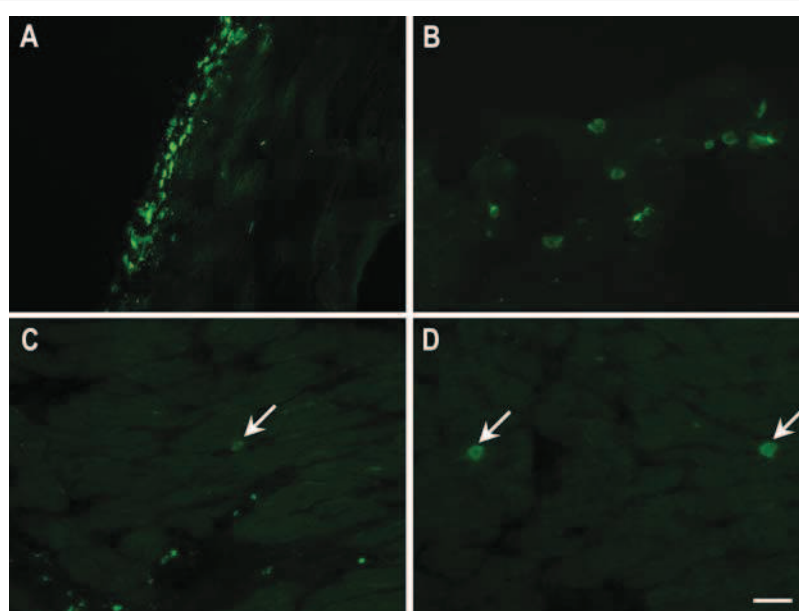
Values are given as mean ± SD.

LV, left ventricular; LVEDV, LV end-diastolic volume; LVESV, LV end-systolic volume; LVEF, LV ejection fraction; Post-Tx, post-transplantation.

\*P = 0.001 vs. baseline.

\*\*P < 0.0001 vs. baseline.

<sup>†</sup>P = 0.05 vs. baseline.



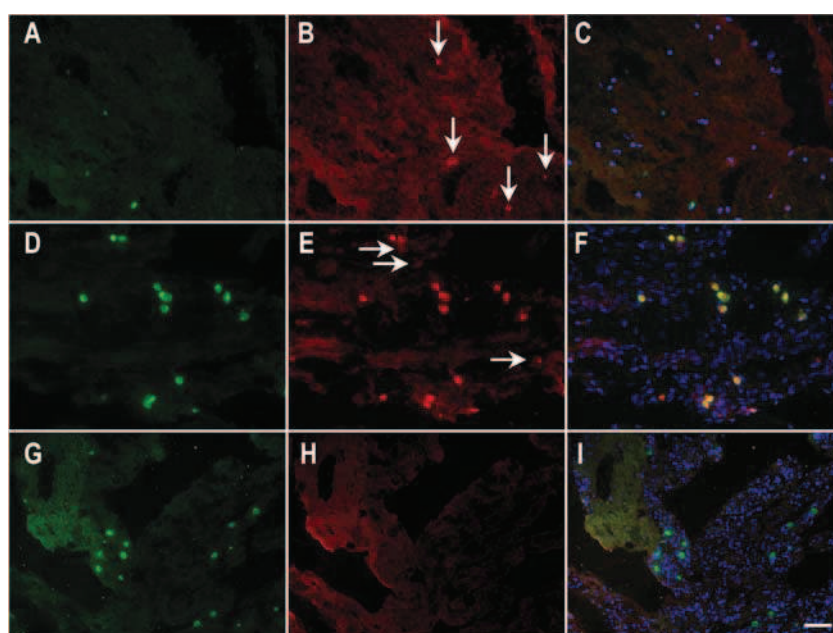
**Figure 4** Detection of grafted cells. Two months after implantation, grafted cells were identified by CD90 (A) and eGFP (B–D) immunostaining in ADSC sheet-grafted (A–C) and ADSC-injected (D) hearts. More cells were detected within the epicardial construct (A–B) and in the infarcted myocardium (C, arrow) after the sheet application compared with direct intramyocardial injections (D, arrows). Bar: 50 µm (A); 25 µm (B–D).

respectively. These differences in LV volumes translated into a trend for a better, albeit not significant, preservation of EF in the cell sheet group [+1.63% (95% CI: –5.0%; +8.3%)] compared with the cell injection group [–3.3% (95% CI: –9.9%; +3.3%)] and in the control group [–20.5% (95% CI: –27.4%; –13.6%)].

### 3.4 Cell engraftment

Two months after transplantation, the sheet-scar interface harboured a mixed population of endothelial cells, macrophages, and myofibroblasts. The grafted cells were detected by CD90 and eGFP immunostaining (Figure 4). In the ADSC sheet hearts, many cells were identified within the epicardial construct (Figure 4A and B) and also in infarcted myocardium (Figure 4C), suggesting that some of these cells had migrated into the myocardium and specifically located around the vessels. Conversely, in the ADSC-injected group, only rare cells were sparsely identified between the residual cardiomyocytes

(Figure 4D). The number of engrafted cells was greater in the cell sheet than in the cell injection group. In the epicardial layers, four of the four eGFP-cell-injected hearts were in the 0–1 (no or minimal amount of cells) range. In contrast, among the six eGFP-cell-sheet-treated hearts which were analysed, two fell in this 0–1 category, while four were in the 2–3 (moderate or large number of cells) range ( $P = 0.07$ ). Interestingly, quantification of intramyocardial eGFP+ cells showed that their number was still higher in the cell sheet (three hearts in the 0–1 range and three in the 2–3 range) than in the cell injection (four of four hearts in the 0–1 range) groups. Because eGFP-positive cells could mistakenly be interpreted as donor cells while they represent macrophages that have engulfed eGFP released by dead cells, sections were also stained for CD68, a marker for macrophages but there was no overlay between the two stainings (Figure 5A and C). Two months after implantation, some of these eGFP+ cells co-expressed



**Figure 5** Phenotypic characterization of eGFP<sup>+</sup>-grafted cells. Two months after implantation, eGFP<sup>+</sup> cells (green fluorescence, A, D, G) were co-immunostained with anti-CD68 (B), anti-rat-specific endothelial cell (RECA) (E), and anti-alpha-actinin (H) antibodies (red fluorescence). Merged images are shown in panels C, F, and I. Nuclei were stained in blue by DAPI. Bar: 50  $\mu$ m (A–C, G–I); 25  $\mu$ m (D–F).

endothelial-cell-specific markers but none co-expressed cardiomyocyte-specific alpha-actinin (Figure 5D–I). Only few *c-kit*<sup>+</sup> cells were identified in each cell-treated group. There was no significant difference in the extent of fibrosis and angiogenesis among the three groups (data not shown).

## 4. Discussion

The major finding of the present study is that, compared with commonly used intramyocardial injections, the epicardial delivery of tri-layered ADSC sheets is associated with greater numbers of retained cells, a better preservation of LV geometry, and ultimately, higher rates of post-infarction survival.

There is now compelling clinical evidence that intramyocardial injections of cells are overall safe, regardless of whether injections are made trans-epicardially or endocardially<sup>14,15</sup> even though electro-mechanically guided intramyocardial injections of stem cells or genes have been reported to cause a significant release of cardiac biomarkers.<sup>16</sup> However, our results draw attention to the fact that injection-induced myocardial tissue disruption can be more damaging than it has usually been considered so far, possibly because most experimental studies commonly report the numbers of animals dying after the index infarct but often fail to detail mortality rates occurring during the follow-up period. Regardless of the cell type, this tissue damage is likely contributed by puncture-induced inflammation along the needle tracks,<sup>17</sup> and the formation of multiple intramyocardial clusters, which can act as electrical barriers that impair direct wave propagation and set the stage for malignant arrhythmias. This could explain why intramyocardial injections of either skeletal myoblasts or bone marrow-derived cells cause more arrhythmic events than when the same cells are delivered through the coronary venous system.<sup>18</sup> The potentially detrimental effects of direct

intramyocardial cell injections on electrical stability are further highlighted by the recent findings of Song et al.,<sup>19</sup> showing that engraftment sites can behave as electroanatomic substrates that initiate re-entries and are associated with a high (31.6%) rate of post-infarction sudden deaths in their occlusion–reperfusion rat model. In the present study, the poorer outcomes after cell injections compared with those of the placebo medium could be explained, in the latter case, by the expected lack of intramyocardial aggregates and the fast clearance of the injected fluid. Although injection-induced tissue damage has been suggested to be volume-dependent,<sup>16</sup> this view is not supported by our finding that reducing this volume by almost one half failed to alter the mortality rate. Cell size is also unlikely to be involved in the poor outcomes of the injection group as ADSC are not larger than myoblasts or mesenchymal stem cells, which have already been largely investigated. However, because cell survival after sheet implantation has been shown to be dose-dependent,<sup>20</sup> we used tri-layered constructs and consequently injected a higher number of cells than in previous mouse<sup>21</sup> or rat studies<sup>9,10</sup> for matching the number of cells harboured in the sheets. While this increased intramyocardial cell concentration may have contributed to reduce the survival rate of injected rats and account for the difference in outcomes compared with previous studies, it is noteworthy that it failed at preventing adverse LV remodelling compared with the epicardial sheet-based delivery approach. Similar conclusions have actually been made in a hamster model of dilated cardiomyopathy<sup>22</sup> and in a rat model of chronic myocardial infarction<sup>3</sup> where myoblast sheet application was compared with intramyocardial injections of myoblasts entailing the same dosing (10 million) as in the present study.

The increased survival rate seen in the sheet group was paralleled by a greater degree of epicardial cell engraftment, with the caveat that the identification of donor cells on the basis of their positive staining

for CD90 and eGFP may have been partly confounded by two issues: (i) some CD90-positive cells could be mesenchymal-type host cells that populated the sheet and (ii) some eGFP-positive cells may be host macrophages that had uptaken the fluorescent dye released by transplanted cells upon their death. However, the lack of overlay between eGFP and CD68, a marker for macrophages (Figure 5), suggests that this was not at least a consistent event that could invalidate our conclusions on the comparative engraftment rates based on eGFP positivity. Paradoxically, direct injections even resulted in smaller numbers of intramyocardial cells than delivery of cell sheets, thereby confirming a high death rate in the former case and the possibility for some sheet-derived cells to migrate in the myocardium, as previously shown in other studies entailing the use of epicardially delivered cell constructs.<sup>23–25</sup> Although it is tempting to relate the greater number of retained cells in the sheet group with the better preservation of function, the mechanism of action of the cells remains elusive. As ADSC failed to convert into new cardiomyocytes, it is likely that grafted cells acted paracrinally on host-associated tissue-protective signalling pathways. Among others, one attractive hypothesis is that factors released by sheet-bound cells could reactivate the embryonic developmental programme in the underlying epicardial cells, thereby driving them towards an epithelial to mesenchymal (EMT) transition that, in turn, could generate new cell constituents of the heart.<sup>26</sup> Our failure to identify a greater expression of *c-kit*<sup>+</sup>, a hallmark of the EMT, in the sheet group does not exclude this hypothesis as EMT would be expected to occur transiently early after transplantation, whereas our assessment was made 2 months later. For that same reason, we did not assess apoptosis whose histologic patterns have usually waned after 2 months.<sup>27</sup> Finally, a paracrine action of the grafted cells on extracellular matrix remodelling is not in contradiction with our finding of a similar extent of fibrosis across the three groups. Namely, scar size may have been overestimated in the sheet group because remnants of the sheet containing extracellular matrix and staining positively for Sirius red could not be distinguished from the infarct-related fibrosis and were thus integrated in the overall calculations.

One could argue that the higher mortality seen in the injection groups simply reflected a natural selection of the animals which, just by chance, had the initially larger myocardial infarcts. This hypothesis is not supported by our pre-transplantation echocardiographic measurements showing similar alterations in LV function in all groups. Rather, it is conceivable that for a given level of baseline functional impairment, the greater survival rate of cells in the sheet group<sup>25</sup> allowed them to release a greater amount of the cardioprotective factors that have been identified by the characterization of conditioned media.<sup>2</sup> Conceivably, the donor-cell-derived paracrine effects could have facilitated the stabilization of LV volumes seen in this study, thereby contributing to reduce heart failure-related mortality. This increased survival of cells when they are patterned in a sheet form is likely the result of their better cohesiveness and anchoring to the self-secreted extracellular matrix, as suggested by our *in vitro* genomic and proteomic findings of the up-regulation of compounds such as Emilin-1 and integrin  $\alpha$ -2, both involved in cell-cell and cell-matrix component adhesion<sup>28–31</sup> and tissue inhibitor of metalloproteinase-1, which is rather involved in the modulation of extracellular matrix turnover but also in the regulation of cell growth and apoptosis.<sup>32,33</sup> The two and a half greater expression of phosphorylated Akt in the sheet group compared with suspended

cells is also consistent with the benefits of cell cohesiveness, as afforded by the sheet, on survival signals and fits with our *in vivo* findings of a greater engraftment in the sheet group. A such, these data sharply contrast with the high rate of apoptotic death inherent in the proteolytic disruption of the cellular microenvironment, which occurs when cells are enzymatically detached for injection.<sup>34</sup> This assumption is supported by the assessment of cell survival kinetics using bioluminescence imaging and showing that adipose stromal cells rapidly die off after injection in the acutely infarcted mouse heart.<sup>35</sup> The higher engraftment rate seen in the sheet group could also reflect, in addition to the enhanced survival intrinsic to the maintenance of intercellular connexions, the avoidance of cell death induced by the physical stress that cells withstand during poorly controlled manually operated injections with regard to duration and pressure. Of note, the better survival of sheet-treated animals compared with those receiving injections documented in our ischaemic scenario has also been reported in a hamster model of dilated cardiomyopathy.<sup>22</sup>

Thus, our data suggest that in the setting of cardiac surgery, which offers the unique opportunity to directly manipulate the heart, the epicardial delivery of a biomaterial might be less traumatic and more effective than transmural injections. While cell sheets prepared onto temperature-responsive dishes are useful for providing the proof-of-concept and have the advantage of avoiding the use of foreign scaffolds, their delicate handling characteristics may preclude realistic wide-scale clinical applications. Cell seeding onto bioresorbable matrices providing a stronger structural support can then represent an acceptable alternative<sup>1</sup> and there is increasing evidence that the benefits of these constructs are further optimized by populating them with mixed cell populations (i.e. cells with a cardiomyogenic differentiation potential and cells featuring trophic properties) whose cross-talks may synergize their cardioprotective effects.<sup>23–25,36</sup>

**Conflict of interest:** none declared.

## Funding

This work was supported by INSERM, by the Fondation de l'Avenir (grant number ET9–547) and by the Fondation Desmarests. H.H. was supported by fellowships from the Agence Universitaire de la Francophonie and the Fondation LeDucq. P.B. was supported by fellowships from the Fondation pour la Recherche Médicale.

## References

- Hamdi H, Furuta A, Bellamy V, Bel A, Puymirat E, Peyrard S et al. Cell delivery: intramyocardial injections or epicardial deposition? A head-to-head comparison. *Ann Thorac Surg* 2009;**87**:1196–1203.
- Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 2006;**12**:459–465.
- Memon IA, Sawa Y, Miyagawa S, Taketani S, Matsuda H. Combined autologous cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and bone marrow cells in canine hearts for ischemic cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;**130**:646–653.
- Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials* 2003;**24**:2309–2316.
- Wang J, Chen L, Zhao Y, Guo G, Zhang R. Cell adhesion and accelerated detachment on the surface of temperature-sensitive chitosan and poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels. *J Mater Sci Mater Med* 2009;**20**:583–590.
- Masuda S, Maeda H, Miao JY, Hayashi H, Araki S. cDNA cloning and some additional peptide characterization of a single-chain vascular apoptosis-inducing protein, VAP2. *Endothelium* 2007;**14**:89–96.
- Kim Y, Kim H, Cho H, Bae Y, Suh K, Jung J. Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Cell Physiol Biochem* 2007;**20**:867–876.



8. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE *et al*. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004;**109**:1292–1298.
9. Danoviz ME, Nakamura JS, Marques FL, dos Santos L, Alvarenga EC, dos Santos AA *et al*. Rat adipose tissue-derived stem cells transplantation attenuates cardiac dysfunction post infarction and biopolymers enhance cell retention. *PLoS One* 2010;**5**:e12077.
10. Mazo M, Planat-Benard V, Abizanda G, Pelacho B, Leobon B, Gavira JJ *et al*. Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction. *Eur J Heart Fail* 2008;**10**:454–462.
11. Valina C, Pinkernell K, Song YH, Bai X, Sadat S, Campeau RJ *et al*. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007;**28**:2667–2677.
12. McCoy L, Tsunoda I, Fujinami RS. Multiple sclerosis and virus induced immune responses: autoimmunity can be primed by molecular mimicry and augmented by bystander activation. *Autoimmunity* 2006;**39**:9–19.
13. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R *et al*. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004;**109**:656–663.
14. Martin-Rendon E, Snowden JA, Watt SM. Stem cell-related therapies for vascular diseases. *Transfus Med* 2009;**19**:159–171.
15. Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GG, Abbate A, Khianey R, Sheiban I, Bartunek J *et al*. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 2007;**50**:1761–1767.
16. Baldazzi F, Jorgensen E, Ripa RS, Kastrup J. Release of biomarkers of myocardial damage after direct intramyocardial injection of genes and stem cells via the percutaneous transluminal route. *Eur Heart J* 2008;**29**:1819–1826.
17. Qu HP, Qin S, Min D, Tang YQ. [The effects of earlier resuscitation on following therapeutic response in sepsis with hypoperfusion]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2006;**44**:1193–1196.
18. Fukushima S, Coppen SR, Varela-Carver A, Yamahara K, Sarathchandra P, Smolenski RT *et al*. A novel strategy for myocardial protection by combined antibody therapy inhibiting both P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 via retrograde intracoronary route. *Circulation* 2006;**114**:I251–I256.
19. Song H, Hwang HJ, Chang W, Song BW, Cha MJ, Kim IK *et al*. Cardiomyocytes from phorbol myristate acetate-activated mesenchymal stem cells restore electromechanical function in infarcted rat hearts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;**108**:296–301.
20. Sekiya N, Matsumiya G, Miyagawa S, Saito A, Shimizu T, Okano T *et al*. Layered implantation of myoblast sheets attenuates adverse cardiac remodeling of the infarcted heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;**138**:985–993.
21. Leobon B, Roncalli J, Joffre C, Mazo M, Boisson M, Barreau C *et al*. Adipose-derived cardiomyogenic cells: in vitro expansion and functional improvement in a mouse model of myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2009;**83**:757–767.
22. Kondoh H, Sawa Y, Miyagawa S, Sakakida-Kitagawa S, Memon IA, Kawaguchi N *et al*. Longer preservation of cardiac performance by sheet-shaped myoblast implantation in dilated cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc Res* 2006;**69**:466–475.
23. Zakharova L, Mastroeni D, Mutlu N, Molina M, Goldman S, Diethrich E *et al*. Transplantation of cardiac progenitor cell sheet onto infarcted heart promotes cardiogenesis and improves function. *Cardiovasc Res* 2010;**87**:40–49.
24. Stevens KR, Kreutziger KL, Dupras SK, Korte FS, Regnier M, Muskheli V *et al*. Physiological function and transplantation of scaffold-free and vascularized human cardiac muscle tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;**106**:16568–16573.
25. Matsuura K, Honda A, Nagai T, Fukushima N, Iwanaga K, Tokunaga M *et al*. Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest* 2009;**119**:2204–2217.
26. van Tuyn J, Atsma DE, Winter EM, van der Velde-van Dijke I, Pijnappels DA, Bax NA *et al*. Epicardial cells of human adults can undergo an epithelial-to-mesenchymal transition and obtain characteristics of smooth muscle cells in vitro. *Stem Cells* 2007;**25**:271–278.
27. Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, Pulkki K, Kallajoki M, Voipio-Pulkki LM *et al*. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;**280**:H2726–H2731.
28. Colombatti A, Doliana R, Bot S, Canton A, Mongiat M, Mungiguerra G *et al*. The EMILIN protein family. *Matrix Biol* 2000;**19**:289–301.
29. Gullberg DE, Lundgren-Akerlund E. Collagen-binding I domain integrins—what do they do? *Prog Histochem Cytochem* 2002;**37**:3–54.
30. Zanetti M, Braghetta P, Sabatelli P, Mura I, Doliana R, Colombatti A *et al*. EMILIN-1 deficiency induces elastogenesis and vascular cell defects. *Mol Cell Biol* 2004;**24**:638–650.
31. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;**69**:11–25.
32. Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* 2008;**1**:re6.
33. Creemers EE, Davis JN, Parkhurst AM, Leenders P, Dowdy KB, Hapke E *et al*. Deficiency of TIMP-1 exacerbates LV remodeling after myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;**284**:H364–H371.
34. Smets FN, Chen Y, Wang LJ, Soriano HE. Loss of cell anchorage triggers apoptosis (anoikis) in primary mouse hepatocytes. *Mol Genet Metab* 2002;**75**:344–352.
35. van der Bogt KE, Schrepfer S, Yu J, Sheikh AY, Hoyt G, Govaert JA *et al*. Comparison of transplantation of adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the infarcted heart. *Transplantation* 2009;**87**:642–652.
36. Sekine H, Shimizu T, Hobo K, Sekiya S, Yang J, Yamato M *et al*. Endothelial cell coculture within tissue-engineered cardiomyocyte sheets enhances neovascularization and improves cardiac function of ischemic hearts. *Circulation* 2008;**118**:S145–S152.

## Résumé

La transplantation cellulaire apparaît aujourd'hui comme une thérapie prometteuse pour certaines formes graves d'insuffisance cardiaque réfractaire aux traitements classiques.

Nous avons tenté dans ce travail d'améliorer la thérapie cellulaire en agissant sur deux paramètres : la perte et la survie des cellules.

Dans une première étape, nous avons comparé les effets de deux méthodes de couverture épocardique des cellules via des biomatériaux cellularisés (feuilles de cellules et une matrice de gélatine) par rapport à ceux des injections conventionnelles dans le myocarde. Nous avons choisi de transplanter des cellules souches musculaires pour une étude de preuve de concept. Une amélioration de la fonction contractile au bout de 1 mois associée à une amélioration de la rétention cellulaire, une augmentation du nombre de vaisseaux sanguins et une diminution du pourcentage de la fibrose ont été enregistrées dans les groupes de biomatériaux cellularisés par rapport au groupe des injections de cellules.

Nous avons tenté de confirmer les bénéfices de la couverture épocardique avec un autre type cellulaire. Nous avons choisi d'utiliser des cellules souches stromales d'origine adipeuse (ADSC pour Adipose Derived Stroma/Stem Cells). Toutefois, et malgré les bénéfices fonctionnels apportés lors des greffes, les feuilles d'ADSC étaient difficilement maniables lors de la chirurgie. De plus, les ADSC ont été incapables de générer de nouveaux cardiomyocytes s'intégrant électriquement et mécaniquement dans le tissu receveur.

L'objectif de « régénération » myocardique requiert l'apport de cellules ayant un potentiel de différenciation cardiaque et devrait donc pouvoir être atteint avec des cellules souches embryonnaires (CSE). Nous avons choisi de travailler avec ce type cellulaire en raison de la possibilité de dériver, à partir de ces cellules, de véritables progéniteurs des cardiomyocytes. Pour limiter les conditions hypoxiques de l'environnement ischémique, nous avons co-transplanté les progéniteurs cardiaques dérivés des CSE humaines avec des ADSC afin d'en exploiter les propriétés trophiques, et d'optimiser ainsi la survie du greffon. Les deux populations cellulaires ont été transférées sur le myocarde infarci via, une matrice de gélatine (GELFILM™) qui représente de meilleures propriétés mécaniques. Lors de cette étude, nous avons remarqué une préservation contre le remodelage ventriculaire à court (1mois) et long (6mois) terme chez les animaux greffés avec les patches co-ensemencés par rapport aux animaux recevant le patch seul et l'étude des patches composites a montré la présence de cellules humaines *in vitro* mais pas *in vivo*, probablement à cause d'une maîtrise insuffisante du rejet.

Notre travail a donc consisté en une analyse systématique de plusieurs paramètres fondamentaux de thérapie cellulaire (méthode de transfert des cellules, limitation des conditions de mort cellulaire après greffes, choix du type cellulaire). Les résultats obtenus valident l'emploi des matrices cellularisées déposées sur l'épicaarde. Il convient maintenant d'optimiser la nature du biomatériau, les conditions de culture des progéniteurs cardiaques avec des cellules trophiques dans le but d'améliorer la survie du greffon.

Mots clés : Insuffisance cardiaque ischémique. Thérapie cellulaire. Cellules souches. Mort cellulaire. Matrice biodégradable. Ingénierie tissulaire.

